

**Synthese und biologische Wirksamkeit Abbau-stabilisierter Liganden der  
SH2-Domäne der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller Universität Jena

von Diplomchemiker Mohammad Safa Zoda,  
geboren am 02. 01. 1971 in Hama (Syrien)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Siegmund Reißmann (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
2. Prof. Dr. Rainer Beckert (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
3. Prof. Dr. Torsten Steinmetzer (Philipps-Universität Marburg)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 26. 04. 2010

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung	1
2	Protein-Tyrosin-Phosphatasen	2
2.1	Funktion der Protein-Tyrosin-Phosphatasen	2
2.2	Klassifizierung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen	2
2.3	Struktur und Katalysemechanismus der katalytischen PTP-Domäne	6
2.4	Rolle von Protein-Tyrosin-Phosphatasen im Krankheitsgeschehen	8
2.5	Die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2	9
2.5.1	Expression von SHP-1	10
2.5.2	Struktur der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1	10
2.5.3	Substratspezifität von SHP-1	11
2.5.4	Funktionen der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1	12
3	SH2-Domänen	15
3.1	Vorkommen von SH2-Domänen	16
3.2	Struktur von SH2-Domänen	16
3.3	Klassifizierung von SH2-Domänen	18
3.4	Liganden der SH2-Domänen von SHP-1	20
4	Peptidsynthese	23
4.1	Wahl der Harze und Schutzgruppen	23
4.2	Aktivierung der Carboxylgruppe der Aminosäure	24
4.3	Nebenreaktionen	25
4.3.1	Aspartimidbildung	25
4.3.2	N-Guanylierung	26
4.3.3	Razemisierung	27
4.4	Zyklische Peptide	29
4.5	Rückgratzyklisierung	29
4.6	Phosphorylierung der Peptide	31
4.7	Peptidsynthesen unter Nutzung der Mikrowelle	33
5	Zielstellung	34
6	Material und Methoden	35
6.1	Materialien	35
6.2	Chemische Charakterisierung der Peptide	37
6.2.1	Dünnschichtchromatographie	37
6.2.2	Flash-Chromatographie	37

6.2.3	Analytische HPLC	37
6.2.4	Semipräparative HPLC	38
6.2.5	Massenspektrometrie	38
6.2.6	NMR-Spektroskopie	39
6.2.7	Einsatz der Mikrowelle	39
6.3	Methoden	40
6.3.1	Synthese der Pseudodipeptide in Lösung	40
6.3.2	Synthese ausgewählter Pseudodipeptide an polymeren Trägern	51
6.3.2.1	Synthese am SASRIN-Harz	51
6.3.2.2	Synthese am 2-Cl-Trityl-Harz	53
6.3.3	Darstellung von Aminosäurederivaten zur Zyklisierung	53
6.3.4	Synthesen von Aminosäurederivaten	54
6.3.5	Festphasenpeptidsynthese	56
6.3.5.1	Darstellung linearer Oktapeptide	56
6.3.5.2	Darstellung zyklischer Oktapeptide	58
6.3.6	Enzymatischer Abbau	64
6.3.6.1	Bestimmung der Stabilität linearer und zyklischer Oktapeptide gegenüber Proteasen	64
6.3.6.2	Stabilität gegenüber Phosphatasen	65
6.3.7	Bestimmung des Einflusses der Oktapeptide auf die Aktivität der SHP-1	65
6.3.8	Zellkuster-Bildung (Focus formation Assay)	66
7	Ergebnisse und Diskussion	67
7.1	Darstellung der N-Alkyl-Tyrosin-Derivate	68
7.2	Darstellung der Pseudodipeptide	69
7.2.1	Ankondensation von Fmoc-Abu-OH an N-Alkyl-Tyrosine	69
7.2.2	Versuche zur Darstellung von N-funktionalisierten Derivaten oder Pseudodipeptiden mit Phosphotyrosin	72
7.2.3	Versuche zur Darstellung des Pseudodipeptides mit Asparagin	72
7.2.4	Darstellung von Pseudodipeptiden am Harz	73
7.2.4.1	Synthese von Fmoc-Asn(Trt) $\Psi$ [CO-N(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-Alloc]Tyr(OH)-OH	73
7.2.4.2	Versuche zur Darstellung eines Pseudodipeptides mit acylierter reduzierter Peptidbindung zwischen Asparagin und Tyrosin	73
7.3	Lineare Oktapeptide	74
7.3.1	Darstellung und Charakterisierung der linearen Oktapeptide	74



7.4	Synthese der zyklischen Peptide	80
7.4.1	Versuche zur Darstellung von Liganden mit einer aromatischen Brücke in der Seitenkette	80
7.4.2	Darstellung und Charakterisierung von Oktapeptidliganden mit aliphatischen und zyklialiphatischen Resten in der Laktambrücke	81
7.5	Stabilität der linearen und zyklischen Oktapeptide gegenüber enzymatischen Abbau	86
7.5.1	Stabilität gegenüber Proteasen	86
7.5.1.1	Abbau des linearen Phospho-Tyrosin Oktapeptides OP 8	87
7.5.1.2	Abbau des zyklischen Phospho-Tyrosin Oktapeptides mit reduzierter Peptidbindung OP 17	88
7.5.1.3	Abbau des Phospho-Tyrosin Oktapeptides mit Rückgratzyklisierung OP 14	89
7.5.2	Stabilität gegenüber Phosphatasen	90
7.6	Biologische Aktivität der linearen Oktapeptide OP 3 bis OP 6 mit Ser( $\beta$ Ph)	90
7.7	Biologische Aktivität der Oktapeptide OP 7 bis OP 17	91
7.7.1	Stimulierung der Aktivität der SHP-1	91
7.7.2	Funktionelle Charakterisierung der Internalisierung von Oktapeptiden in NIH 3T3-Zellen (Klusterbildungs-Test)	93
8	Zusammenfassung	96
9	Literaturverzeichnis	98
	Selbständigkeitserklärung	111
	Erklärung zu früheren oder laufenden Promotionsverfahren	112
	Lebenslauf	113

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen für Aminosäure- und Peptidderivate wurden entsprechend den Empfehlungen des „Nomenclature Committee of IUB (NC-IUB)“ und der „IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)“ vorgenommen (*Eur. J. Biochem.* 183, 1984, 9-37). Die Aminosäuren und Aminosäurederivate besitzen, wenn nicht anders gekennzeichnet, L-Konfiguration.

Zusätzlich verwendete Abkürzungen:

Abu( $\beta$ Ph)	$\alpha$ -Amino- $\beta$ -Phenylbuttersäure
AcCN	Acetonitril
Ado	8-Amino-3,6-dioxa-oktansäure
$\epsilon$ -Ahc	$\epsilon$ -Amino-hexan-carbonsäure
Alloc	Allyloxycarbonyl
Amc	<i>trans</i> -Amino-methyl-cyclohexan-carbonsäure
AP-1	Aktivator Protein-1
APD	N-Alloc-1,4-Phenylendiamin
Äqu.	Äquivalent
AS	Aminosäure
Ava	$\delta$ -Aminovaleriansäure
ber.	berechnet
BLNK	B-Zell Linker Protein
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
(Boc) <sub>2</sub>	Di-tert.-butyldicarbonat
BTC	Bis-(trichlormethyl)-carbonat
BTSA	N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
Bu <sup>t</sup>	tert.-Butyl
CAM	Zelladhäsionmolekül
CD45	Cluster der Differenzierung
c-Ki <sup>t</sup>	Stammzellfaktor- Rezeptor
CRALBP	zelluläres Retinaldehyd-Binde-Protein
CRK	CT10 Regulierung der Kinase
CSF	Koloniestimulierender Faktor
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid

DCM	Dichlormethan
Dmcp	Dimethylcyclopropylcarbiny
CPBA	<i>m</i> -Chlorperbenzoesäure
DEP	Density-enhanced protein-tyrosine phosphatase-1
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N-Ethyldiisopropylamin
DMAP	4-N,N-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ESI-MS	Elektrospray-Massenspektrometrie
F.	Schmelzpunkt
FAP	Fibroblasten-Aktivierungsprotein
FERM-Domäne	(P4.1, Ezrin, Radixin, Moesin ) Domäne
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
g	Gramm
gef.	gefunden
GLEPP-1	glomeruläre Epithel Protein-1
gp49	Glykoprotein 49
GRAP	Grb2-ähnliches Adaptorprotein
Grb	Wachstumsfaktor-Rezeptor-Bindungprotein
HATU	<i>N</i> -[(Dimethylamino)(1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]pyridin-1-yl)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium <i>N</i> -oxid hexafluorophosphat
HBTU	<i>O</i> -Benzotriazolyl- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat
HDTU	<i>O</i> -(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HePTP	hämatopoietische Tyrosin-Phosphatase
HOAt	7-Aza-1-hydroxy-1,2,3-benzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IFN	Interferon
IL-2	Interleukin 2
IP3	Inositoltrisphosphat
IRAK	Interleukin-Rezeptor assoziierte Kinase

ITIM	Immunorezeptor Tyrosin-basierendes inhibitorisches Motiv
Jak	Januskinase
JSP-1	Jun stimulierende Phosphatase-1
KIR	Killerzell-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor
KTIM	Kinase Tyrosyl-based Inhibitory Motiv
LAR	Leucocyten-Antigen-related
LcK	Lymphozyten Protein-Tyrosin-Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
MeOH	Methanol
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
M	Molekulargewicht
N-CAM	neuronales CAM
NFκB	Nuklearer Faktor κB
NKG	NK Zell-Gruppe
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pfp	Pentafluorphenyl
PLC-γ1	Phospholipase-γ1
PRL-3	Phosphatase der Regeneration der Leber-3
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog
PTB	Phospho-Tyrosin Binde-Domäne
PTPN	non-Rezeptor Protein-Tyrosin-Phosphatase
pY	Phosphotyrosin
PyAOP	7-Aza-1,2,3-benzotriazolyl-oxy-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris (pyrrolidino) phosphonium-hexafluorophosphat
PyBroP	Brom-tris (pyrrolidino) phosphonium-hexafluorophosphat
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
Ros	Onkogen des „Aviral sarcoma virus UR2“(University of Rochester)

SAP-1	Magenkrebs assoziierte Protein-Tyrosin-Phosphatase
SASRIN	Super Acid-sensitives Harz (Resin)
SH	Src homology
SHB	Src-homologes Protein B
SHC	Src-homologes Kollagenprotein
SHP-2	Protein-Tyrosin-Phosphatase mit SH2-Domänen
SLNK	SH2-Linker related to BLNK
SOCS	Suppressor des Zytokin-Signalings
SRC	Homologes zu v-src (sarcoma viral oncogene)
STAT	Signaltransducer und Aktivator der Transkription
Syk	Spleen Tyrosin-Kinase
TEA	Triethylamin
TEC	Thymic epithelial cells
TFA	Trifluoressigsäure
TFFH	Tetramethyl-fluoroformamidinium hexafluorophosphat
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
TrkA	Tyrosin-Rezeptor-Kinase A
Trt	Trityl (Triphenylmethyl)
ZAP-70	Zeta-assoziiertes Protein 70 KD

## 1. Einleitung

In Signaltransduktionsprozessen wird die Aktivität vieler Proteine hauptsächlich durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Kinasen und Phosphatasen sind die Gegenspieler in diesem fein abgestimmten Regulationsprozess. Bezogen auf die Tyrosinphosphorylierung sind die konkreten Gegenspieler Proteintyrosinkinasen (PTKs) und Proteintyrosinphosphatasen (PTPs). Vertreter dieser Enzymfamilie sind an der Regulation zahlreicher biologischer Prozesse beteiligt. So ist die Proteintyrosinphosphatase SHP-1 ein negativer Regulator multipler Signaltransduktionprozesse. Sie gehört zur Gruppe der intrazellulären Phosphatasen und kommt vor allem in Zellen des Immunsystems, aber auch in Nervenzellen sowie in Spermien vor. Die SHP-1 spielt vor allem im Reifungsprozess dieser Zellen eine Rolle [1,2].

Die Aktivierung der SHP-1 erfolgt durch Bindung von Liganden an ihre N-terminale SH2-Domäne. Im ligandenfreien Zustand blockiert die SH2-Domäne das katalytische Zentrum der SHP-1. Die Bindung eines Liganden führt zu einer Konformationsänderung der SH2-Domäne und damit zur Freigabe der katalytischen Domäne. Für die physiologischen Funktionen ist die Bindung der SH2-Domäne an das ITIM-Motiv wesentlich [3].

Wegen ihrer entscheidenden Rolle in der Signaltransduktion sind Kinasen und Phosphatasen interessante Zielproteine für potentielle Arzneimittel. Dazu können entweder ihre aktiven Zentren gehemmt oder die Bindedomänen (SH2, PTB, IP<sub>3</sub>) durch aktivierende oder inaktivierende Liganden besetzt werden [4].

Voraussetzung für diese sogenannte Signaltransduktionstherapie ist die Internalisierung der Inhibitoren oder Liganden in die entsprechenden Zellen. Das kann mit Hilfe von untoxischen Penetrationshelfern, z.B. Zell-penetrierenden Peptiden, gelingen, setzt aber eine Stabilisierung der Inhibitoren oder Liganden gegen enzymatischen Abbau voraus. Im Falle der sehr selektiv wirksamen, aber leicht abbaubaren Peptide erfordert das eine Stabilisierung gegen Proteasen und möglichst auch gegen Phosphatasen. Dazu können entweder nichtproteinogene Aminosäuren in die Peptide eingebaut oder die Peptide zyklisiert werden [5, 6, 7]. Eine besonders effektive, aber synthetisch sehr anspruchsvolle Methode ist dabei die Rückgratzyklisierung. Abgeleitet vom Modelling eines angepassten Liganden für die SH2-Domäne der SHP-1 und einer angestrebten Phosphatasestabilität des Phosphotyrosin-Restes wurde von uns die Rückgratzyklisierung solcher Oktapeptidliganden versucht, bei denen die Lactambrücke am Phosphotyrosin beginnt.

Voraussetzung für die Synthese von derartigen Peptiden ist die Entwicklung geeigneter

N-funktionalisierter Tyrosinderivate und darauf aufbauend die Darstellung entsprechender Pseudodipeptide. Diese Synthesen stellen eine große Herausforderung dar und bedürfen der Erprobung verschiedener Schutzgruppenkombinationen, verschiedener Aufbaustrategien und geeigneter Bedingungen für die Tyrosin-Phosphorylierung. Der Vergleich der Stabilitäten der unterschiedlichen Peptide gegenüber enzymatischem Abbau und ihrer biologischen Aktivitäten, gemessen an isolierter SHP-1 und nach Internalisierung in lebende Zellen, sollte eine Entscheidung über einen möglichen Einsatz dieser Peptidmodifizierung in der Signaltransduktionstherapie erlauben.

## **2. Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs)**

### **2.1 Funktionen der Protein-Tyrosin-Phosphatasen**

Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen von Proteinen in lebenden Organismen sind an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt. Ca. 30% aller zellulären Proteine sind Phosphoproteine [8]. Die Phosphorylierung von zellulären Proteinen erfolgt an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten. Obwohl der Anteil an Tyrosinphosphorylierten Proteinen nur 0,05 bis 0,1% der Gesamtposphorylierung in der Zelle ausmacht, ist diese posttranslationale Modifikation essentiell für die Steuerung vieler physiologischer Prozesse [9, 10]. Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) können sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf einen Signal-Weg ausüben und spielen eine entscheidende physiologische Rolle in einer Vielzahl von Zellen und Geweben. Die Tyrosinphosphorylierung ist ein reversibler, dynamischer Prozess, der durch die Aktivität von Proteintyrosinkinasen (PTKs) und deren Gegenspielern, den Proteintyrosin-phosphatasen (PTPs) kontrolliert wird. Die Tyrosinphosphorylierung kann von wesentlicher Bedeutung für die Kontrolle des Zellzyklus, des Zellwachstums, der Differenzierung, des Metabolismus, der Zell-Zell-Kommunikation, der Zellmigration, der Gen-Transkription, der Aktivität der Ionenkanäle und der Immunantwort sein. Fehlerhafte Phosphorylierungen tragen zur Entwicklung von Krankheiten bei [11].

### **2.2 Klassifizierung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen**

Die systematische Zusammenstellung der wesentlichen Gruppen der Protein-Tyrosin-Phosphatasen in Abbildung 2 macht die enorme Diversität und Vielfalt dieser Proteinklasse deutlich und weist auf ihre zentrale biologische Funktion in der Regulation der intrazellulären und interzellulären Kommunikation hin. Die PTPs können auf Grund ihrer zellulären

Lokalisation in zwei große Untergruppen eingeteilt werden: die Rezeptor-ähnlichen PTPs und die intrazellulären PTPs.

#### *Rezeptor-ähnliche Protein-Tyrosin-Phosphatasen (RPTPs)*

Die Rezeptor-ähnlichen PTPs lassen sich in 8 Klassen (R 1 bis 8) unterteilen. Sie bestehen aus einem extrazellulären und einem intrazellulären Bereich mit einer oder zwei Phosphatase-Domänen sowie einer Transmembrandomäne. Die **Klasse R1 der RPTPs** umfasst die CD45 Familie, die ausschließlich im hämatopoetischen System exprimiert wird [12, 13]. Ihr extrazellulärer Bereich weist zwei Spektrin-ähnliche Elemente und eine Fibronectin (FN)-III-ähnliche Domäne auf [14]. CD45 spielt eine notwendige Rolle in der Signaltransduktion von B und T-Zellen [15, 16]. Die **RPTPs der Klasse 2** sind die LAR-ähnlichen PTPs. Dazu gehören z.B. die Drosophila-LAR (DLAR), die LAR des Menschen sowie die PTP $\sigma$ , PTP $\delta$ , PTP $\kappa$  und PTP $\mu$ . Charakteristisch für die LAR-ähnlichen PTPs ist eine Kombination von Immunglobulin (Ig)-ähnlichen und FN-III-ähnlichen Domänen im Extrazellulärbereich. Es treten im Extrazellulärbereich Strukturelemente auf, die für Zelladhäsionsmoleküle typisch sind und beispielsweise in CAM oder N-CAM zu finden sind [17, 18]. Die meisten LAR-ähnlichen PTPs werden im neuronalen Gewebe exprimiert und spielen eine fundamentale Rolle in der neuronalen Entwicklung. LAR wird an der Zelloberfläche als Protein aus zwei nicht kovalent miteinander verknüpften Untereinheiten gebildet [19, 20]. Die Klasse R2A der PTPs enthält eine MAM-Domäne, eine Immunglobulin-ähnliche und mehrere Fibronectin-III-ähnliche Domänen innerhalb des extrazellulären Bereiches. MAM-Domänen sind auch in einer Reihe von Zelladhäsions-Molekülen zu finden [21].

Als extrazelluläres Strukturmerkmal weisen **Klasse-3-Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen** charakteristischerweise ausschließlich Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domänen in unterschiedlicher Anzahl auf. Zudem besitzen die Mitglieder dieser Klasse lediglich eine einzige intrazelluläre PTP-Domäne. Entsprechend dieser Strukturmerkmale werden dieser Klasse PTP $\beta$ , DEP-1, SAP-1, Glepp1 [22, 23, 24, 25] zugeordnet.

PTP $\alpha$  und PTP $\epsilon$  bilden die **Klasse 4**, mit nur sehr kurzem extrazellulärem Bereich und ohne erkennbare Strukturhomologien [26, 22]. RPTPs der **Klasse 5** haben eine sogenannte Carboanhydrase-Domäne und eine Fibronectin-III-ähnliche Domäne im extrazellulären Bereich. Die Carboanhydrase-Domäne weist eine Homologie zu dem Enzym Carboanhydrase auf, wobei die essentiellen Aminosäuren für deren katalytische Aktivität jedoch nicht konserviert sind. Vertreter der **Klasse 5** sind PTP $\gamma$  und PTP $\xi$  (RPTP $\beta$ ) [27, 28]. Eine lösliche Form des extrazellulären Bereiches der PTP $\xi$  wurde im Gehirn als Phosphacan, ein



Chondroitin-Sulfat Proteoglycan, identifiziert [29]. Die **Klasse R7** besitzt nur eine intrazelluläre PTP-Domäne und einen sehr kurzen extrazellulären Bereich.

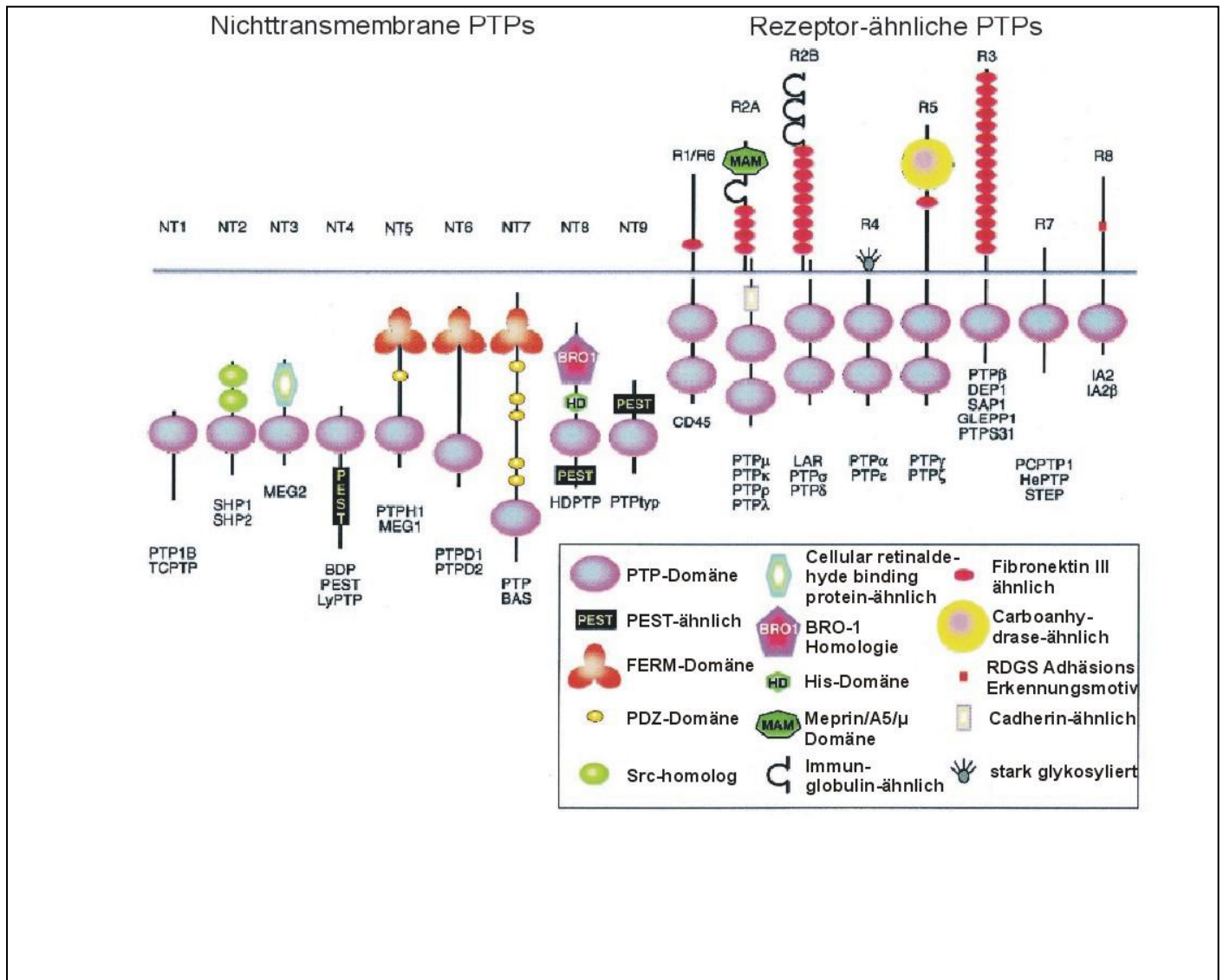


Abb. 1: Schematische Darstellung der Familie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen nach Andersen [13]

Neben den RPTP-Formen existieren zudem eine Reihe intrazellulärer Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen. Ferner wird durch Proteolyse dieser intrazellulären Formen ihre Lokalisation reguliert [30, 31]. PTP-STEP [32] und HePTP [33] sind Vertreter dieser Klasse. Bei den ähnlich aufgebauten Phosphatasen der **Klasse R8**, wie z.B. PTP-IA-2 [34], ist der extrazelluläre Bereich im Vergleich zu R7-PTPs länger und zudem durch das RDGS-Adhäsions-Erkennungsmotiv gekennzeichnet.

### *Intrazelluläre Protein-Tyrosin-Phosphatasen*

Die zytoplasmatischen Proteintyrosinphosphatasen haben eine einzelne katalytische Domäne, die in den meisten Fällen von speziellen Aminosäure-Sequenzen flankiert wird. Die Einteilung in verschiedene Gruppen (NT1-9) erfolgt auf der Basis unterschiedlicher Struktur- und Funktionsmotive. PTP1B und TC-PTP, die eine 75%ige Homologie innerhalb der katalytischen Domäne aufweisen, bilden die Klasse **NT1** [35, 36]. Beide enthalten C-terminal einen hydrophoben Sequenzbereich, der die PTP-1B im endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. die TC-PTP im perinuklearen Raum verankert [37, 38]. Die unmittelbare Lokalisation von PTP1B am endoplasmatischen Retikulum scheint für die Regulation der katalytischen Aktivität von Bedeutung zu sein. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass die durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Protease vermittelte proteolytische Spaltung von PTP1B zu deren Freisetzung aus dem ER führt und dies mit einer Zunahme der katalytischen Aktivität einhergeht. Ähnlich wurde für TC-PTP eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität durch Entfernung des carboxyterminalen Segmentes beobachtet [38]. Die Klasse **NT2** der intrazellulären PTPasen enthält die beiden nahe verwandten Vertretern SHP-1 und SHP-2. Beide Enzyme besitzen zwei SH2-Domänen und eine PTP-Domäne [39, 40, 41]. SHP-1 wirkt negativ-regulatorisch auf die durch Zytokin-Rezeptoren vermittelte Signaltransduktion. Obwohl PTPs generell als negative Regulatoren der über Tyrosinphosphorylierung vermittelten Signaltransduktion anzusehen sind, ist die verwandte SHP-2 für eine positive Weiterleitung des Signals bei einigen RTKs erforderlich [42]. Eine andere Untergruppe der intrazellulären PTPs ist PTP-Meg2, ein Vertreter der Klasse **NT3**. PTP-Meg2 wurde ursprünglich aus Megakaryozyten kloniert. Diese Klasse hat eine PTP-Domäne und eine CRALBP-Domäne, die eine hohe Homologie zum zellulären Retinaldehyd-Bindeprotein sowie zu Sec14p, einem Lipidaustauscherprotein der Hefe aufweisen [43].

Intrazelluläre Phosphatasen wie PTP-PEST und die im Nukleus lokalisierte PEP (LyPTP) bilden die Klasse **NT4** und zeichnen sich durch eine sogenannte PEST (Pro-Glu-Ser-Thr)-Sequenz aus, die in anderen Proteinen zu einer erhöhten Degradation führt [44]. Die Klassen **NT5-7** der intrazellulären PTPs, (PTPH1, MEG-1, PTPD1 und PTP-BAS) sind durch das Vorkommen von FERM- und PDZ-Domänen charakterisiert. Die ca. 320 Aminosäuren lange FERM-Domäne weist Homologien zu Proteinen auf, die an Aufbau und Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind, so z.B. Ezrin, Radixin und Talin. Die in unterschiedlicher Anzahl vorliegenden PDZ-Domänen vermitteln Interaktionen mit anderen Proteinen [45, 46]. Eine Sonderstellung innerhalb der zytoplasmatischen Phosphatasen nehmen die „dualspezifischen“ Phosphatasen ein, die die Abspaltung einer Phosphatgruppe sowohl von Tyrosin- als auch von

Serin-/Threonin-Resten katalysieren können. Dieser Gruppe zugeordnete Phosphatasen weisen nur eine sehr geringe Homologie zu anderen Mitgliedern der Familie der Tyrosin-spezifischen Phosphatasen auf. Gemeinsam ist ihnen lediglich die für den katalytischen Mechanismus maßgebliche Sequenz, die den essentiellen Cystein- sowie den benachbarten Histidinrest einschließt [47].

### 2.3 Struktur und Katalysemechanismus der katalytischen PTP-Domäne

Die Kristallstrukturen der katalytischen Domänen verschiedener PTPs, z.B. SHP-1, SHP-2, PTP $\alpha$ , PTP $\mu$ , PTP1B und Yersinia PTP, sind durch Protein-Kristallographie bestimmt worden. Die katalytische PTP-Domäne enthält 230 bis 250 Aminosäuren. Diese sind in 12  $\beta$ -Faltblättern und 6  $\alpha$ -Helices angeordnet. Das eigentliche katalytische Zentrum besteht aus nur vier parallelen  $\beta$ -Faltblättern, die von  $\alpha$ -Helices flankiert werden. Es befindet sich im Innern einer Furche der Proteinoberfläche, die bei klassischen PTPs tiefer ist (9Å) als bei dualspezifischen Phosphatasen (nur 6Å). Dieser Unterscheid erklärt auch die höhere Substratspezifität der klassischen PTPs [48, 11].

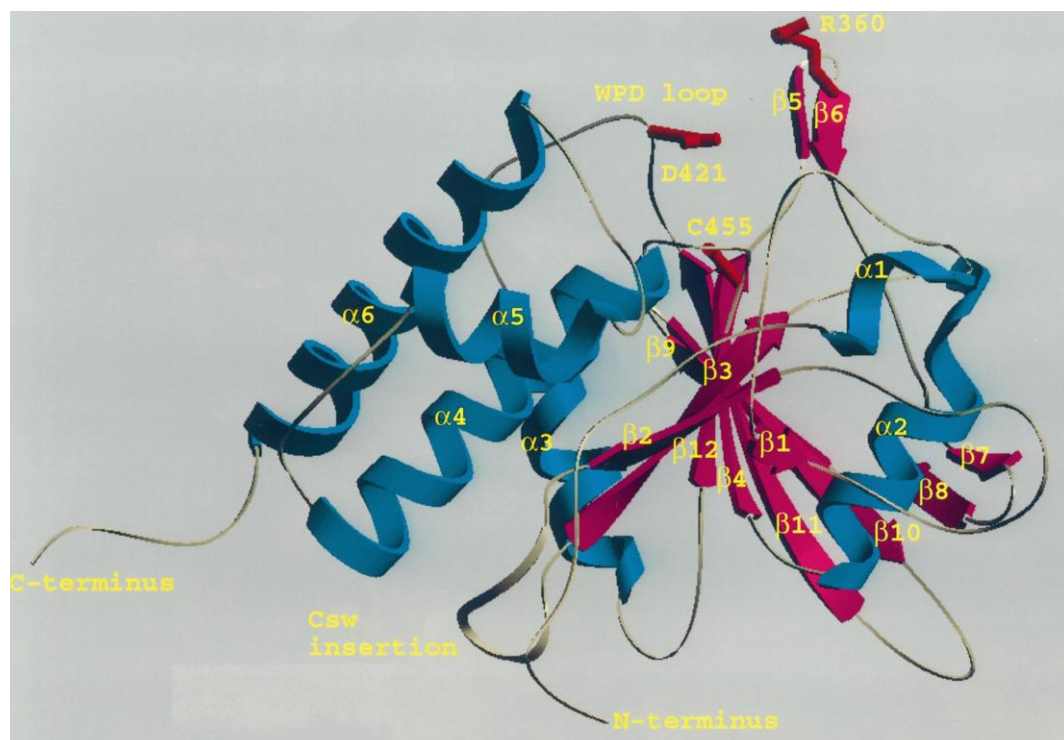


Abb. 2: Katalytische Domäne der Protein-Tyrosin-Phosphatase [11]

Im Bereich des katalytischen Zentrums besteht eine ausgeprägte Homologie. Sie ist durch die Konsensussequenz (I/V)HCXAGXGR(S/T)G gekennzeichnet [27, 9]. Die Bindungsstelle für

Phosphotyrosin liegt in der oben erwähnten Tasche auf der Oberfläche des Proteins. Die vier Seiten der Bindungstasche werden durch das **5 $\beta$ -Schleife-6 $\alpha$**  Motiv ( **$\alpha$**  oder  **$\beta$** ) gebildet. Die Substrat Bindungstasche befindet sich zwischen einem  $\beta$ -Strang, der mit den Resten His und Cys endet, und einer  $\alpha$ -Helix, die mit Arg [Thr/Ser] beginnt. Der katalytische Cys-Rest ist am Boden der Tasche positioniert.

Der allgemeine Mechanismus der Katalyse verläuft folgendermaßen (z.B. für PTP-1B): Das negativ geladene phosphorylierte Substrat wird durch Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren der Phosphat-bindenden Schleife (P-Schleife) und zu einem hoch konservierten Arginin in der Bindungstasche fixiert. Darüber hinaus stabilisiert ein in der Nähe befindlicher  $\alpha$ -Helix-Dipol das Phosphat. Die Bindung des Substrats bewirkt eine Konformationsänderung des Enzyms, wobei sich die WPD-Schleife über die substratbindende Tasche schiebt und weitere stabilisierende Wechselwirkungen ermöglicht. Diese sind für die Substratspezifität und die katalytische Aktivität entscheidend. Im geschlossenen Zustand befindet sich Asp in der Nähe des Substrats und bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem phenolischen Sauerstoffatom des Phosphotyrosins. Weiterhin wird der Phenylring des Phosphotyrosins zu beiden Seiten von Tyr und Phe eingeschlossen, mit denen er hydrophobe Wechselwirkungen eingeht. Der zentrale Schritt der Katalyse ist ein nucleophiler Angriff durch ein deprotoniertes Cystein, der zur Bildung einer kovalenten Thiophosphoryl-Zwischenstufe führt. Eine Mutationsanalyse ergab, dass eine Substitution des Cysteins in der aktiven Bindungstasche die enzymatische Aktivität komplett unterbindet [49]. Der Cysteinrest in der aktiven Bindungstasche von PTPs ist besonders sauer, weil mehrere Wasserstoffbrücken das Thiolat-Ion stabilisieren, von denen eine von der proximalen OH-Gruppe einer konservierten Ser/Thr-Domäne gebildet wird [50]. Die fünffach koordinierte Zwischenstufe wird durch ionische Wechselwirkungen mit dem positiv geladenen Arg stabilisiert [51]. Das acide Asp stabilisiert durch Protonierung den Aufbau einer negativen Ladung [52]. In einem zweiten Schritt wird die Zwischenstufe durch ein Wassermolekül angegriffen, das von Asp deprotoniert wird. Dieser Schritt setzt das Cystein frei und regeneriert nach Abdissoziation des Produktes das ursprüngliche Enzym [53]. Die konservierten, zum Arg proximalen Ser/Thr-Reste in der katalytischen Schleife erleichtern die Hydrolyse des Enzym-Phosphoryl-Adduktes, möglicherweise indem sie durch eine Wasserstoffbrücke den Aufbau einer negativen Ladung am Schwefelatom während der Hydrolyse der Phosphoryl-Enzym-Zwischenstufe stabilisieren [54].

## 2.4 Die Rolle von Protein-Tyrosin-Phosphatasen im Krankheitsgeschehen

Da Protein-Tyrosin-Phosphatasen Schlüsselfunktionen in der Signaltransduktion ausüben, folgt daraus, dass Störungen der PTP-Aktivität zu Krankheiten führen. Zum einen führen Mutationen, durch die PTPs inaktiviert werden, zu genetisch bedingten Erkrankungen. Zu diesen gehören die Lafora-Krankheit [55] oder die Autoimmunkrankheit „systemischer Lupus erythematodes“ [56]. Zum anderen fungieren viele PTPs als Tumorsuppressoren [57]. Sie können bei diversen Krebsarten mutiert oder unterexprimiert sein. Die Untersuchung des Phänotypes von Mäusen, die Mutationen im SHP-1-Gen enthalten, erlaubt Einblicke in die physiologische Funktion von SHP-1. Die Abwesenheit von SHP-1 wie in dem motheaten (me/me) Mausstamm oder die Expression von einer katalytisch fehlerhaften SHP-1 wie in den noch lebensfähigen motheaten (mev/mev)-Mäusen führt zu einer schweren Immunschwäche. Diese dokumentiert sich in einer fleckigen Dermatitis, einer extramedullären Hämatopoiesis, in Splenomegalie, in hämorrhagischer Pneumonitis und in Sterilität. Veränderungen des Spiegels oder der Aktivität der SHP-1 sind auch beim Menschen mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, z.B.: mit Leukämie und Lymphomen [58].

Die Tabelle 1 zeigt die Beteiligung von PTPs an der Entstehung von Krankheiten.

Tab.1: Beteiligung von PTPs an Krankheiten [9]

Krankheitsklasse	Beteiligte PTPs	Physiologische Effekte
Immunkrankheiten, Transplantationen, Entzündungen	SHP-1	Mutation verursacht „mottenzerfressenen Phänotyp“ [59] negativer Regulator allergischer Reaktionen [60]
	CD45 PTP- $\epsilon$	Inhibitoren als mögliche Wirkstoffe gegen Xenograft-Abstoßung [61] Immunantwort [62]
Tumorerkrankungen	PTEN	Tumorsuppressorgen [63]
	PTPa	aktiviert Src- und Fyn-Kinase [64]
	Cdc25-A, Cdc25-B	stimulieren das Fortschreiten des Zellzyklus, oncogene Funktionen [65]
	FAP-1	Apoptoseinduktion [66]
	HePTP	reguliert extrazellulär regulierte Kinasen (ERKs), Veränderungen in der HePTP-Expression wurden mit hämatopoetischer Malignität in Zusammenhang gebracht [67]
	PRL-3	Tumormetastasen [68]
	PTP1B	dephosphoryliert und aktiviert c-Src in humanen Brustkrebs-Zelllinien [69]
	JSP-1	aktiviert die MAP-Kinase Jnk [70]
	SAP-1	negativer Regulator des Integrin-Signalwegs, in hepatozellulären Krebsgeschwüren herunterreguliert [71]
	RPTP-b/PTP-z	in einer Glioblastom-Zelllinie hoch exprimiert [72]
	SHP-2	Mutation verursacht juvenile myelomonozytische Leukämie [73]
	SHP-1	Tumorsuppressor durch den Abbau von JAK-Kinasen [74]
	PTP-c	in Nieren- und Lungenkrebsarten häufig ausgeschaltet [75]
	CD45	korreliert mit der Proliferation von Myelomzellen [76]

	PacP (saure Prostataphosphatase)	reduzierte Aktivität in Prostatakrebszelllinien [77]
	MKP-1	bei einigen Krebsarten überexprimiert [78]
Neurologische Erkrankungen und Neuroprotektion	Laforin	Mutation verursacht progressive myoklonische Epilepsie vom Lafora-Typ [55]
	LAR	Herunterregulierung verhindert Apoptose, Inhibition könnte zur Nervenregeneration genutzt werden [79]
	PTP-s	Nervenregeneration ist in PTP-s-Knockout-Mäusen beschleunigt [80]
	CD45	Alzheimer-Krankheit [81]
	SHP-1	Neuroprotektion [82, 83]
Infektionskrankheiten	SHP-2	Neuroprotektion [84]
	Yersinia YopH	essenziell für die Virulenz [85]
	Salmonella SptP	essenziell für die Virulenz [85]
	SHP-1	Leishmaniose [86]
	SHP-2	Aktivierung durch Helicobacter pylori [87]
	MPtpA und MPtpB	Mycobacterium tuberculosis [88]
Diabetes	RPTP-a und RPTP-b/PTPz	Target von VacA von Helicobacter pylori [89]
	PTP1B	PTP1B-Knockout-Mäuse sind diabetesresistent [90]
	LAR	Überexpression verursacht Insulinresistenz [91]
Osteoporose	PTP-e	Alendronat-Inhibitor [92]
	GLEPP-1	renale rezeptorartige PTP, Inaktivierung führt zu einer veränderten Podozytenstruktur [93]
Fettleibigkeit	PTP1B	PTP1B-Knockout-Mäuse sind gegen Fettleibigkeit resistent [90]
	SHP-2	negativer Regulator des bei Fettleibigkeit wichtigen Leptin-Signalweges [94]

## 2.5 Die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2

Die SHP-1 (auch als HCP, PTP1C, Hcph, SH-PTP1, PTPN6 bezeichnet) gehört zu der Gruppe der „Nicht-Transmembran-Protein-Tyrosin-Phosphatasen“. Sie ist eine für hämatopoetische Gewebe spezifische intrazelluläre Phosphatase, deren Struktur durch das Vorliegen von zwei SH2-Domänen in Tandemposition und N-terminal zur katalytischen Domäne charakterisiert ist [95]. Die SHP-1 ist in die Regulation von vielen Signalkaskaden und Zellfunktionen einbezogen [1]. So kann sie z.B. sehr effektiv Substrate der Src-Kinase dephosphorylieren [97]. Die Spezifität und Aktivität von SHP-1 wird offenbar in kombinatorischer Weise durch verschiedene Mechanismen reguliert. Generell erfordert die Wirkung von SHP-1 eine Bindung direkt an das am Tyrosin phosphorylierte Targetprotein oder an ein am Tyrosin phosphoryliertes Adaptormolekül in unmittelbarer Nachbarschaft des oder der Targets. Die Bindung an SHP-1 erfolgt zumeist über die N-terminale SH2-Domäne. Die Besetzung der N-terminalen SH2-Domäne durch einen am Tyrosin phosphorylierten Liganden führt zur Aktivierung. Die SHP-2 (auch als Syp, PTP1D, PTPN11, SHPTP2, PTP2C bezeichnet) weist gegenüber der SHP-1 eine Sequenzhomologie von ca. 60% auf [98].

### **2.5.1 Expression von SHP-1**

SHP-1 zeigt ein Expressionsmuster, das vor allem in hämatopoetischen Zellen, in bestimmten Epithelzellen, in Astrozyten und in Oligodendrozyten des ZNS identifiziert wurde [99, 100, 96]. Zwei wichtige Formen der SHP-1-Transkripte wurden als SHP-1 (I) und SHP-1 (II) bei Menschen und Mäusen bezeichnet. Das Gen für SHP-1 ist im menschlichen Genom auf Chromosom 12 (12p13.31) lokalisiert [101] und besteht aus 17 Exons. Die Gensequenzen von SHP-1 (I) und SHP-1 (II) sind innerhalb jeder Spezies mit Ausnahme der am 5'-Ende untranslatierten Regionen identisch. Die Sequenz MLSRG bildet den N-Terminus der SHP-1 (I), die insgesamt 597 Aminosäuren umfasst, die Sequenz MVR stellt die ersten drei Aminosäuren der SHP-1 (II) dar, die insgesamt aus 595 Aminosäuren besteht. Beide Varianten haben vergleichbare katalytische Aktivitäten [102, 103].

### **2.5.2 Struktur der Protein Tyrosin Phosphatase SHP-1**

Eine Besonderheit von SHP-1 ist das Vorhandensein zweier „src-Homologie 2“-Domänen (SH2-Domänen), die vor der katalytischen Domäne liegen. Die aminoterminal SH2-Domäne umfasst die Aminosäuren 1-108. Die Aminosäuren 116-208 bilden die C-terminale SH2-Domäne, die Positionen 270-532 die typische Phospho-Tyrosin-Phosphatase (PTP)-Domäne. Die Kristallstruktur der Phosphatase SHP-1 des Menschen wurde mit Ausnahme der 61 carboxyterminalen Aminosäuren bereits 2003 von Yang et al. [98] beschrieben und ist in Abbildung. 3 dargestellt.

Die beiden SH2-Domänen sind wie zwei Antennen auf der zentralen PTP-Domäne angeordnet. Weil die N-terminale SH2-Domäne ohne SH2-Ligand mit der PTP-Domäne interagiert, kommt es zu einer Selbst-Hemmung der SHP-1. Die C-terminale SH2-Domäne zeigt keine deutliche Schnittstelle mit einer der anderen beiden Domänen. Die aus den Aminosäuren 270-532 gebildete PTP-Domäne besteht aus 10 gegeneinander gewundenen  $\beta$ -Faltblatt-Strängen, die auf der konvexen Seite von vier und auf der konkaven Seite von zwei  $\alpha$ -Helices flankiert werden. Die Struktur der katalytischen Domäne ohne Ligand ist nahezu identisch mit derjenigen mit Peptid-Ligand.



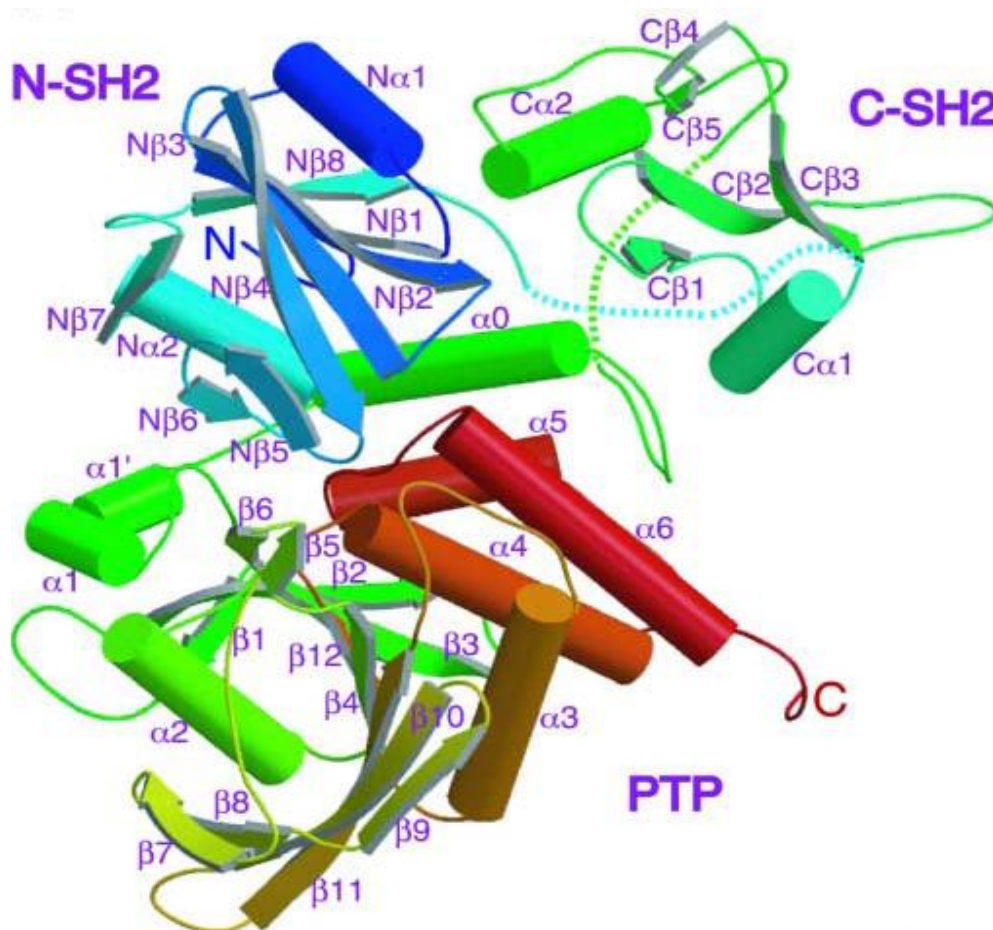


Abb.3: Struktur der SHP-1 nach Yang et al 2003 [98]

Die Regionen zwischen der N-SH2- und der C-SH2-Domäne (Aminosäuren 109-115) sowie zwischen der C-SH2-Domäne und PTP-Domäne (Aminosäuren 209-231) können über die Elektronen-Dichte-Karten konformationell nicht eindeutig bestimmt werden.

### 2.5.3 Substratspezifität von SHP-1

Die katalytische Domäne von SHP-1 besitzt die charakteristischen Merkmale der PTPs, die im Abschnitt 2.3 aufgeführt sind. Die vier Seiten der Substrat-Binde-Tasche werden gebildet durch das  $\beta$ 5-Loop- $\beta$ 6-Motiv, einem Teil der  $1\alpha$ -Helix mit der Schleife zwischen  $1\alpha$ -Helix und  $1\beta$ -Schleife, der Schleife zwischen  $5\alpha$ -Helix und  $6\alpha$ -Helix und dem WPD-Loop (Trp419-Pro428). Elektrostatische Berechnungen zeigen, dass die pY-Bindetasche stark elektropositiv geladen ist. Im Wesentlichen interagieren die vier Seitenkettenreste Lys<sup>273</sup>, Lys<sup>279</sup>, Arg<sup>277</sup> und Arg<sup>360</sup> mit dem Phosphotyrosin-Rest des Substrates [48]. Die Substratspezifität der SHP-1 wurde von Wang et al. [48] beschrieben und hat als Substratsequenz (D/E)-X-L/I/V-X<sub>n</sub>-pY-X-X-(L/I/V) (n: 1,2). Die C-terminalen Reste der Peptide reagieren mit der  $\alpha$ 1/ $\beta$ 1-Schleife. Weitere Spezifitäten resultieren aus den Aminosäuren N-terminal des pY-2-Restes. Diese



interagieren mit dem  $\beta$ 5-Schleife- $\beta$ 6-Motiv (Abb. 4) [105]. Die Aminosäuren Asp oder Glu in Position pY-4 reagieren mit dem Arginin-Rest 360 in der  $\beta$ 5-Schleife- $\beta$ 6.

	Schleife $\alpha$ 1/ $\beta$ 1	$\beta$ 5-Schleife- $\beta$ 6	$\alpha$ 5-Schleife- $\alpha$ 6			
	(277-281)	(356-362)	(491-502)			
SHP-1	RYKNI	VEKGRNK	QM <del>V</del> RAQ <del>R</del> S-G <del>M</del> VQ			
SHP-2	RYKNI	VERGKSK	QM <del>V</del> RSQ <del>R</del> S-G <del>M</del> VQ			
PTP1B	RYR <del>D</del> V	MEKGSLK	LEM <del>R</del> K <del>F</del> RM-G <del>L</del> I <del>Q</del>			
	P-4	P-2	P+1	P+2	P+3	P+4

Abb. 4: Vergleich der Aminosäuresequenzen für Schleife  $\alpha$ 1/ $\beta$ 1,  $\beta$ 5-Schleife- $\beta$ 6 und  $\alpha$ 5-Schleife- $\alpha$ 6 in SHP-1, SHP-2 bzw. PTP1B und ihrer Interaktion mit dem Substrat

## 2.5.4 Funktionen der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1

### *Funktion SHP-1 in lymphatischen Zellen*

Die Stimulation der Antigenrezeptoren auf B und T-Lymphozyten lösen komplexe intrazelluläre Signalkaskaden aus, die zu vielfältigen zellulären Reaktionen (z.B. Proliferation, Differenzierung) führen können [106, 107]. Über die Antigen-Rezeptoren erfolgt eine Aktivierung von Kinasen (Src, Lyn, Fyn, Lck und Blk) mit anschließender Tyrosinphosphorylierung der „immunoreceptor tyrosine-based activation motives“ (ITAMs: YxxLx<sub>(6-8)</sub>YxxL) in der zytosolische Rezeptor-Domäne. Die phosphorylierten ITAM-Regionen schaffen das Gerüst für die Membranrekrutierung von anderen Signaleffektoren, die SH2-Domänen enthalten [108, 109]. Die SHP-1 kann diese Phosphorylierung rückgängig machen und konnte deshalb als negativer Regulator der Lymphozytenaktivierung identifiziert werden [110].

### *Rolle der SHP-1 in B-Zellen*

Der B-Zell-Rezeptor (BCR) ist ein Multiproteinkomplex bestehend aus einem membranständigen Immunglobulin und dem nicht kovalent gebundenen Heterodimer aus Ig $\alpha$  und Ig $\beta$  [111]. Wie von Schamel et al. [112] gezeigt werden konnte, ist die SHP-1 in

ruhenden B-Lymphozyten mit dem B-Zell-Rezeptor assoziiert und dephosphoryliert Igα/Igβ [113]. Die Bindung von multivalentem Antigen vernetzt die BCRs auf der Oberfläche der B Zellen. Dadurch werden die zytoplasmatischen Domänen von Igα und Igβ in direkten Kontakt zueinander gebracht. Dies führt zur Aktivierung der Proteintyrosinkinase-Familien Src, Syk- und Tec. Diese phosphorylieren die Tyrosine im zytoplasmatischen Teil von Igα/Igβ. Die SHP-1 kann an solche Rezeptoren binden, die das ITIM-Motiv enthalten (CD22, CD72 und RIP-B) und dadurch den MAP-Kinase Weg und die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung negativ regulieren.

#### *Rolle SHP-1 in T- Zellen*

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) enthält neben Antigen-spezifischen Ketten invariante Ketten des CD3-Komplexes, die durch zytosolische Tyrosinkinasen phosphoryliert werden können [114, 115]. An diese Phosphotyrosin-Reste können Signalproteine mit SH2-Domänen (Kinasen Adaptorproteine) andocken. Ihre Dephosphorylierung durch SHP-1 (z.B. der TCR ζ-Kette) stellt ein wichtiges Regulationsprinzip für die Aktivität der T-Zellen dar. Eine Ausschaltung der SHP-1 (me/me Mäuse) führt zu einer erhöhten Produktion von IL-2 [116, 117]. Die Überexpression von SHP-1 in T-Zell-Linien führt dagegen zu einer Hemmung der TCR-vermittelten Phosphorylierung der TCR ζ-Kette und damit zu einer verminderten IL-2 Produktion (118-119). Interessant ist, dass sowohl in T-Zell-Linien als auch in primären Thymozyten 20-30% der SHP-1 in Lipid-Rafts lokalisiert sind [118]. Dieser Teil der SHP-1 ist an der Verringerung der IL-2 Bildung beteiligt.

Die Aktivierung der T-Zellen ist ein streng kontrollierter Prozess, an dem auch hemmende Rezeptoren beteiligt sind. Auch diese transmembranalen Rezeptoren enthalten ITIM-Motive (V/L/I X **pY** X X L/V) [120] oder ein Schalter Motiv ITSM (T X **pY** X X V/I) [121]. Auf der Grundlage von pY Peptid-Bibliotheken wurde vorhergesagt, dass ITIMs und ITSMs gute Erkennungs-Motive für die SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 sind [122]. Die SHP-1 scheint dabei der wesentliche Vermittler der inhibitorischen Funktion zu sein [110]. Studien über die SHP-1 der T-Zellen aus lebensfähigen methathymen Mäusen haben gezeigt, dass die SHP-1 eine negative regulatorische Rolle auf der Funktion der T-Zellen spielt [2]. Im Einklang mit dem gesenkten Schwellenwert für TCR-Aktivierung führt SHP-1 zu einer Steigerung der positiven Selektion von Thymozyten.

#### *Funktion SHP-1 in Epithelzellen*

Die SHP-1 fungiert für drei Familien transmembranaler-Rezeptoren als negativer Regulator der intrazellulären Signalweiterleitung: Dazu gehören Rezeptoren von Wachstumsfaktoren

mit einer intrinsischen Tyrosinkinase-Aktivität (z.B. c-Kit, CSF-1, TrkA und EGF) [123, 124], Zytokin-Rezeptoren (z.B. Epo-R, IFN $\alpha$ / $\beta$ -R, IL-3R und IL-2R) [125, 126] und an der Immunantwort beteiligte Rezeptoren, wie der T-Zell-Rezeptor-Komplex CD5 [127]. Zu den Wachstumsfaktor Rezeptoren, die von der SHP-1 dephosphoryliert werden, gehören außer den oben angeführten auch die Rezeptoren des Insulin-ähnlichen-Wachstumsfaktors (ILGF) und des Plättchen-aktivierten Wachstumsfaktors (PDGF). Eine direkte Assoziation von SHP-1 konnte mit der phosphorylierten Rezeptortyrosinkinase Ros nachgewiesen werden, die durch die N-terminale SH2-Domäne von SHP-1 und dem Phosphotyrosinrest pY2267 der Ros-Kinase vermittelt wird. Die SHP-1 ist stromabwärts ein wichtiger Regulator der Ros-Signaltransduktion im epididyalen Epithelium [128]. Eine Überexpression dieser zytoplasmatischen Phosphatase führt zur Dephosphorylierung von Ros und damit zu einer starken Verringerung der Ros-abhängigen Proliferation und Transformation. Die SHP-1 dephosphoryliert auch das p120-Catenin in A431 Zellen und spielt dadurch eine Rolle bei der Regulierung der Cadherin-vermittelten epithelialen Zell-Zell-Adhäsion [129].

#### *Rolle der SHP-1 in mikrobiellen Infektionen, besonders bei Leishmaniose*

Bei der Abwehr mikrobieller Infektionen spielen die Makrophagen eine sehr wesentliche Rolle. Durch Phagozytose und anschließende oxidative Zerstörung können körperfremde Komponenten vernichtet und ausgeschleust werden. An der durch Zytokine induzierten Synthese von NO, dem oxidativen Abbau und anderen Reaktionen der Makrophagen sind PTPs wesentlich beteiligt. Besonders gut sind diese Zusammenhänge bei Leishmaniose untersucht, einer Krankheit von der laut WHO im Jahre 2000 mehr als 12 Millionen Menschen betroffen waren. *Leishmania donovani* infizieren Makrophagen und können sich darin vermehren. Das ist nur möglich, weil sie die Makrophagen inaktivieren. Ihr freigesetzter Elongationsfaktor EF-1 $\alpha$  bindet an die N-terminale oder an beide SH2-Domänen der Makrophagen SHP-1 und aktiviert diese. Die aktivierte SHP-1 ihrerseits inaktiviert die infizierten Makrophagen. Trotz mehr als 80%-iger Sequenzhomologie hat der Makrophagen EF-1 $\alpha$  keinen Einfluss auf die Aktivität der SHP-1 [130, 131, 132]. Diese ausgeprägte Sequenzspezifität und die Kenntnis der Ligandenselektivität der SH2-Domänen bieten Möglichkeiten zur Entwicklung von Arzneimitteln zur Behandlung von Leishmaniose.

Der Feinmechanismus der Makrophagen-Inaktivierung wird folgendermaßen beschrieben. Die aktivierte SHP-1 tritt in Wechselwirkung mit der „IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinase-1“ (IRAK-1) und dephosphoryliert diese. Die Interaktion von SHP-1 und IRAK-1 erfolgt über KTIM [1]. Für das Fortschreiten der Krankheit ist die Hemmung der NO-Synthese

entscheidend. Darüber hinaus wird die Aktivierung der JAK-2 und des MAP-Kinase-Weges blockiert, was die Translokation der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 in den Zellkern verhindert.

#### *Funktion SHP-1 in Killerzellen*

Natürliche Killerzellen (NK) machen 5 bis 12% der zirkulierenden Lymphozyten aus und sind in der Lage, abnormale Zellen, wie Tumorzellen und virusinfizierte Zellen, zu erkennen und abzutöten. Sie spielen deshalb eine wichtige Rolle bei der Infektions-Abwehr und der Tumor-Überwachung. Die Rekrutierung und Aktivierung der SHP-1 erfolgt durch die Phosphorylierung des inhibitorischen Rezeptors [133]. Ein wichtiger aktivierender Signalweg wird durch den NK-Zell-Rezeptor (FcR) ausgelöst und führt zur Aktivierung von solchen PTKs wie Ick, ZAP-70 und Syk und solchen Signal-Effektoren wie PLC $\gamma$  [134]. Die aktivierenden Signale werden durch inhibitorische Rezeptoren, einschließlich KIR, gp49, LTR-1/IL-2 Rezeptoren und transmembranalen Proteinen (CD94, NKG2) über die Interaktion mit SHP-1 negativ reguliert [135]. Obwohl diese inhibitorischen Rezeptoren unterschiedliche Strukturen besitzen, enthalten die meisten eine oder mehrere zytosolische ITIM-Domänen. Nach der Interaktion mit MHC Klasse I-Proteinen übertragen sie das inhibitorische Signal auf die Zielzelle [136]. Zum Beispiel führt die Stimulation der inhibierenden KIR Familie zu einer Tyrosin-Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des KIR Rezeptors. Dies ermöglicht es der Phosphatase SHP-1, an die phosphorylierten KIR Domänen zu binden. Dadurch wird die SHP-1 aktiviert und kann den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav-1 dephosphorylieren, wodurch dieser inaktiviert wird. Die NKG2-vermittelte Signalkaskade kann so durch inhibierende Rezeptoren blockiert werden. Ähnlich wie bei den KIR-Rezeptoren kann auch die ITIM-vermittelte Rekrutierung der SHP-1 zu einem inhibitorischem Signal führen.

### **3. Die SH2-Domänen**

Die Src Homologie 2 (SH2) Domänen enthalten ca. 100 Aminosäurereste. Sie vermitteln Protein-Protein-Interaktionen über die Erkennung und Bindung eines phosphorylierten Tyrosin-Restes (pY) in unterschiedlichen Proteinen. Das geschieht in Abhängigkeit von der umgebenden Aminosäuresequenz. Die SH2-Domänen haben wichtige Funktionen in den intrazellulären Signalwegen [122].

### 3.1 Vorkommen von SH2-Domänen

SH2-Domänen kommen in Proteinen mit sehr unterschiedlichen Funktionen vor, z.B. in Adaptormolekülen (Grap, Grb2), Gerüst-Proteinen (BLNK/SLP-65), Enzymen (Zap70, Syk), auch in an der Ubiquitinylierung (Cbl) beteiligten Enzymen und in Transkriptionsfaktoren (Abbildung 5).

### 3.2 Struktur von SH2-Domänen

Die dreidimensionalen Strukturen verschiedener Gruppen von SH2-Domänen mit gebundenen Phosphotyrosin-Peptiden wurden von Bradshaw et. al. [138] mittels Röntgenkristallographie und Kernspinresonanz untersucht. In Abbildung 6 ist die Raumstruktur der SH2-Domäne der Src-Kinase dargestellt, die ein Phosphopeptid gebunden hat. Diese Domäne wird als allgemeine Struktur einer SH2-Domäne betrachtet. Sie enthält in ihrem Zentrum einen „sieben-strängiger antiparallelen  $\beta$ -Mäander“, der aus  $\beta$ -Faltblatt-Motiven gebildet wird. Das  $\beta$ -Faltblatt-Motiv wird auf beiden Seiten von  $\alpha$ -Helices flankiert. Zwischen der  $\alpha$ -Helix B und dem  $\beta$ -Strang G liegt der BG-Loop. Die  $\beta$ -Stränge E und F bilden die EF-Schleife. Der Ligand der SH2-Domäne wird durch ein kompliziertes Netz von hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen gebunden. Für die meisten SH2-Domänen ist der gebundene Phosphopeptid-Ligand eine längere Kette, die senkrecht zu dem  $\beta$ -Faltblatt liegt. Der Phosphotyrosin-Rest sitzt in einer tiefen Tasche und jeder Phosphat-Sauerstoff beteiligt sich an Wasserstoffbrücken [139, 140]. Die beiden Arginin-Reste Arg  $\alpha$ A2 und Arg  $\beta$ B5 spielen eine besondere Rolle in Phosphatbindung durch elektrostatische Wechselwirkungen. Der Phenylring des Tyrosins stabilisiert die Struktur zusätzlich durch eine Kationen- $\pi$ -Elektronen Wechselwirkung zu Arg in  $\alpha$ A2. In weitere stabilisierende Wechselwirkungen sind die Seitenketten- und Hauptketten-Atome in dem  $\beta$ D-Strang involviert. Die Bindung des Phosphotyrosins liefert etwa die Hälfte der freien Bindung-Energie [141]. Der große aktive Beitrag des Phosphotyrosin-Restes zur SH2-Domänenbindung unterscheidet deutlich zwischen phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Sequenzen. Die Dephosphorylierung führt dadurch zu einer raschen Beendigung des Zell-Signals, da der dephosphorylierte Ligand schnell von der SH2-Domäne abdissoziieren kann. Die C-terminalen Aminosäurereste der

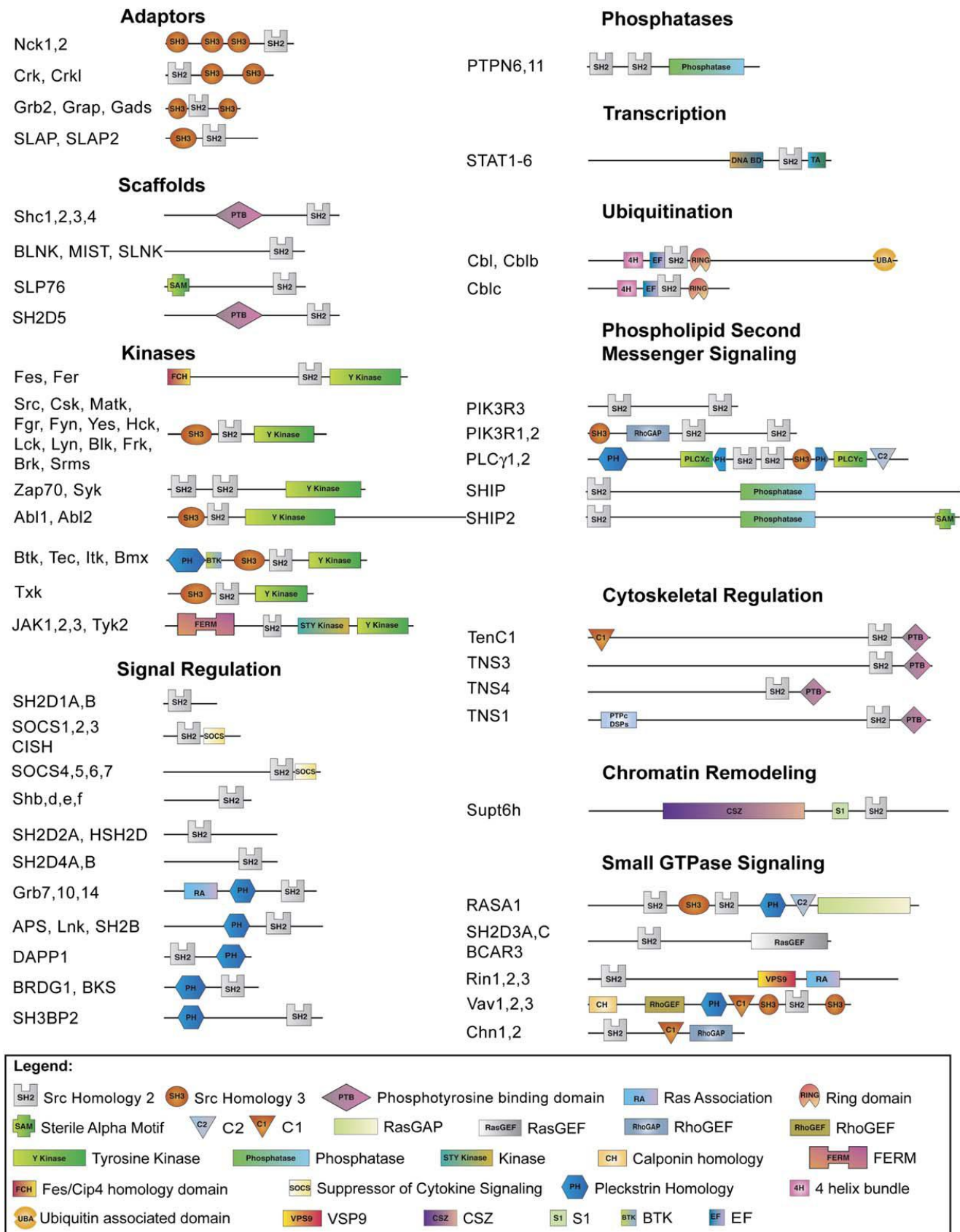


Abb. 5: Vorkommen von SH2-Domänen in Proteinen unterschiedlicher Funktionen [137]

gebundenen Phosphopeptide in den Positionen pY +1 bis pY +3 haben sich als wichtig für die Interaktion mit den BG- und EF-Loops erwiesen [142].

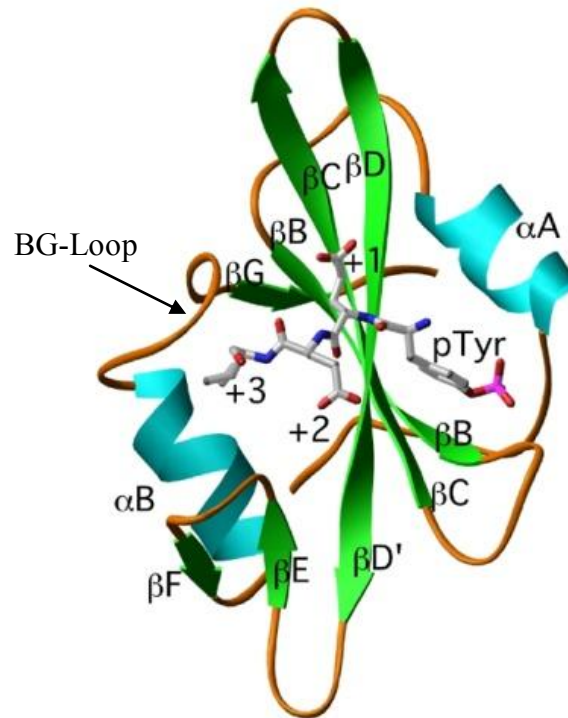


Abb. 6: Kristallstruktur der SH2-Domäne von Src-Kinase mit gebundenem Phosphopeptid [140].

### 3.3 Klassifizierung von SH2-Domänen

Der Phosphatrest des Phosphotyrosins wird in einer tiefen Tasche der SH2-Domäne gebunden. An ihrem Ende befindet sich ein invarianter Arginin-Rest (Arg  $\beta$ B5), der das negativ geladene Phosphat über eine zweizählige Wechselwirkung bindet. Entscheidend für die Bindungsspezifität einer SH2-Domäne sind die Nachbarsequenzen des Phosphotyrosin-Restes. Im Allgemeinen wird die Spezifität einer SH2-Domäne von den Aminosäure-Resten bestimmt, die sich C-terminal zum Phosphotyrosin-Rest des Peptides in den Positionen 3-5 befinden.

Weil ein gebundenes Peptid normalerweise senkrecht zum zentralen  $\beta$ -Faltblatt der SH2-Domäne in gestreckter Konformation vorliegt, ist die Interaktion zwischen der SH2-Domäne und dem Peptid weitgehend unabhängig von den angrenzenden Sequenzen des Proteins. Dies macht es möglich, die Spezifität und den Bindemechanismus einer SH2-Domäne mit Hilfe kurzer synthetischer Peptide zu studieren. Unser heutiges Wissen über die Spezifität der SH2-

Domänen resultiert aus Untersuchungen mit einzelnen Peptiden und mit Peptid-Bibliotheken [143].

Von Songyang et al. [144] wurden SH2-Domänen nach der Aminosäure in Position  $\beta$ D5 (Nomenklatur der Struktur der Src SH2-Domäne) in vier Gruppen eingeteilt. Diese Position bildet Kontakte mit den beiden pY+1 und pY+3-Resten der Phosphopeptid-Liganden und spielt deshalb eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der Spezifität der SH2-Domänen. Huang et al. [145] dagegen klassifizierten die SH2-Domänen des Menschen anhand der  $\beta$ D5-Identität nur in drei große Gruppen. Gruppe I der SH2-Domänen enthält einen aromatischen Rest (Tyr oder Phe) an dieser Position, Gruppe II einen hydrophoben Rest wie Ile, Leu, Val an gleicher Position und Gruppe III hat hydrophile Aminosäuren wie Glu, Gln und Lys in Position  $\beta$ D5. Die Gruppe I der SH2-Domänen kann nach ihren Liganden verfeinert in Untergruppen eingeteilt werden. So hat die Untergruppe IA, die in den Kinase-Familien Src, Syk, ZAP-70 und TEC sowie in den Adaptorproteinen Nck1 und Nck2 vorkommt, das gemeinsame Motiv pY: -negativ-negativ-hydrophob. Die Untergruppe IB kommt in den Signalproteinen CRK, CRKL, SHIP-1, SHIP-2 und SH2D1A vor. Diese Domäne ist charakterisiert durch das Vorkommen hydrophober Reste in der Position pY+3. Die Selektivität in den Positionen pY+1 oder pY+2 ist für diese Untergruppe geringer als für die Untergruppe IA. Die Untergruppe IC ist gekennzeichnet durch einen Asn-Rest an Position pY+2. Sie stellt die zweitgrößte Untergruppe innerhalb der Gruppe I mit 18 Mitgliedern dar. Sie kommt nicht nur in den GRB2/GRAP/GADS-Familien, sondern auch in den GRB7/10/14-, Tensin-, und Fes/Fer- Familien vor. Auch die Gruppe II der SH2-Domänen kann nach ihrer Subspezifität in vier Untergruppen eingeteilt werden. Untergruppe IIA besitzt das degenerierte Motiv pY hydrophobe AS-X-hydrophobe AS. Diese Untergruppe kommt in mehreren Proteinfamilien vor. Dazu gehören z.B. VAV, PI3Kinasen, PLC $\gamma$ , PTPN, und SOCS.



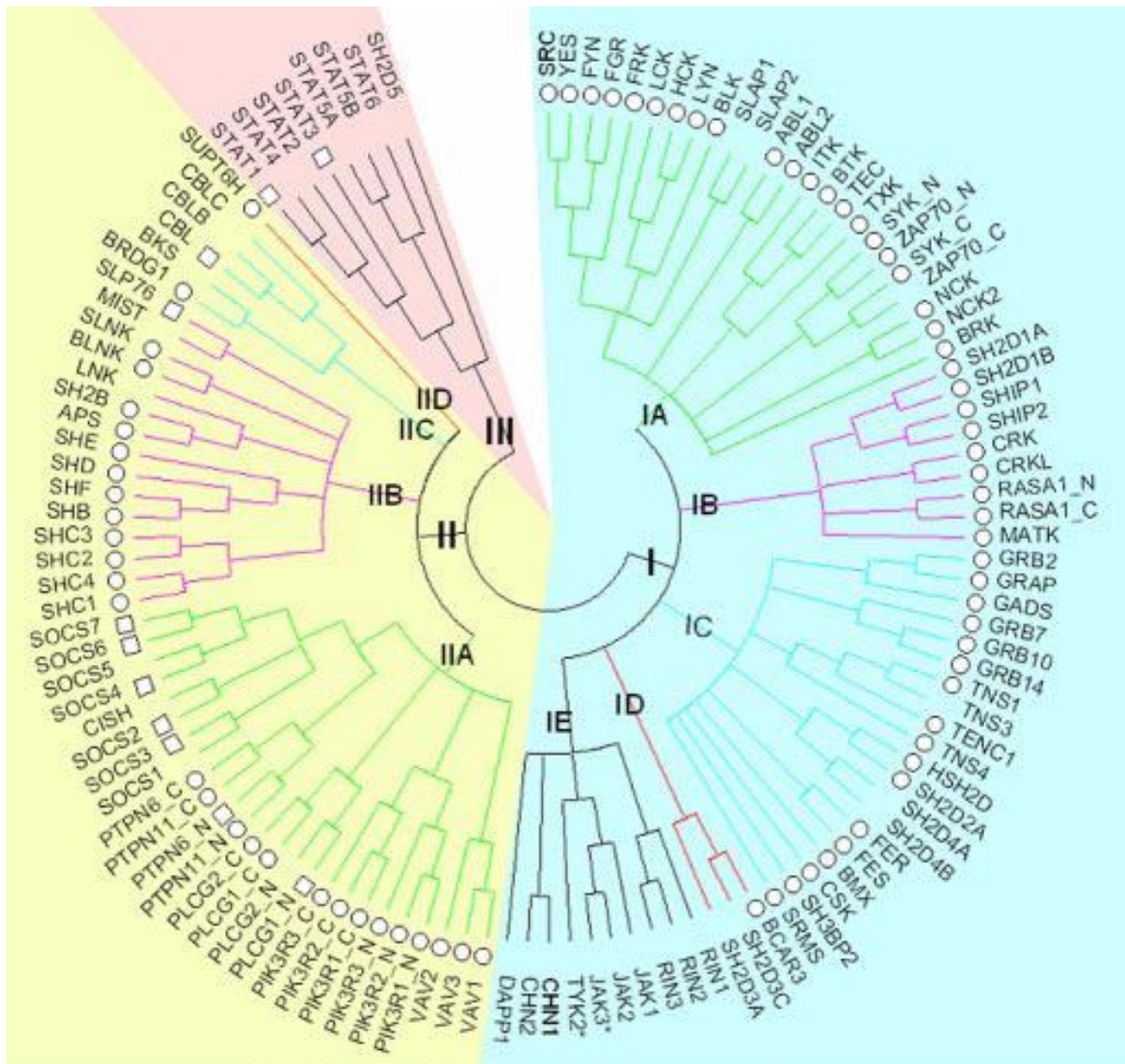


Abb. 7: Klassifikation der menschlichen SH2-Domänen nach Huang et al. [145]

Die Liganden der Untergruppe IIB besitzen einen hydrophoben Rest in Position pY+3 innerhalb der allgemeinen Konsensus-Sequenz pY-(E/D/X)-X-hydrophobe AS. Die SHC und SHB Familien der Adaptorproteine, BLNK, und SLNK besitzen diese Untergruppe von SH2-Domänen. Die Gruppe III der SH2-Domänen kommt vorwiegend in den STAT-Proteinen vor. Diese SH2-Domänen sind nicht nur durch die Bindung an  $\beta$ D5-Rest charakterisiert. Die Gruppe III hat eine besondere Bindungsstelle für die pY+4 Position des Liganden, der an dieser Stelle hydrophile Reste wie Thr oder Asp enthalten muss [146].

### 3.4 Liganden der SH2-Domänen von SHP-1

Da die SH2-Domänen der SHP-1 mit einer Vielzahl von intrazellulären Proteinen oder intrazellulären Teilen von Membranrezeptoren, die das Bindungsmotiv ITIM enthalten, und

dem Ros-Rezeptor assoziieren können, gibt es ein großes Interesse an der Identifikation von spezifischen und hoch affinen Liganden (Tab. 2). Die Spezifität einer SH2-Domäne wird neben N-terminalen Aminosäure-Resten im Wesentlichen vom dem pY-Rest und den C-terminal folgenden drei Aminosäure-Resten bestimmt. Die SHP-1 bevorzugt in den Positionen pY+1 und pY+3 (pYΦxΦ) hydrophoben Aminosäuren [145]. Beebe et al. [147] zeigten, dass die C-terminale SH2-Domäne der SHP-1 eine hohe Selektivität für hydrophobe Aminosäuren (z. B. Leu, Ile, Val) in Position -2 besitzt und dass diese Position entscheidend für die meisten Bindungs- und Aktivierungsprozesse ist. Durch den Vergleich der pY-Motive verschiedener Rezeptoren wurde diese Spezifität auch für die N-terminale SH2-Domäne von SHP-1 gefunden. Durch synthetische Phosphotyrosin-Peptid-Bibliotheken, die sich in diesen Positionen unterscheiden, konnte man optimale Peptidliganden für beide SH2-Domänen ermitteln [122]. Die C-terminale SH2-Domäne der SHP-1 kann zwei unterschiedliche Konsensus-Sequenzen erkennen, sowohl die der Klasse I (V/I/L)-X-pY-A-X-(L/V) als auch die der Klasse II (X-X-pY(Y/F)-M-(K/R)). Auch die N-terminale SH2-Domäne bindet mit ähnlicher Affinität an beide Klassen von Konsensus-Sequenzen (Tab.2) und stimuliert damit effizient die katalytische Aktivität der SHP-1.

Tab. 2: Konsensus-Sequenzen der SH2-Domänen von SHP-1 [147 ]

Klasse	N-SH2	C-SH2
I	LX <b>p</b> Y(M/F)X(F/M)	(T/V/I)X <b>p</b> Y(C/A/T)X(L/M/V)
II	LX <b>p</b> YAXL	XX <b>p</b> Y(Y/F)M(K/R)

In der Tabelle 3 sind die Erkennungssequenzen sehr unterschiedlicher physiologischer und pathophysiologischer Proteine zusammengestellt. Alle diese Proteine sind in der Lage die SHP-1 über die Bindung an ihre N-terminale SH2-Domäne zu aktivieren. Die Vielzahl der Interaktionspartner weist auf Beteiligung der SHP-1 an einer großen Anzahl von intrazellulären Prozessen hin.

Tab. 3: Erkennungssequenzen von Humanproteinen für die N-terminale SH2-Domäne der Phosphatase SHP-1 [122].

Interaktionspartner	Bindemotive
Biliäres Glykoprotein-1(CD66,CEACAM-1)	VT <b>p</b> YSTLNFE, II <b>p</b> YSEVKKQ
CD72	IT <b>p</b> YADLRFV
Killer-Zellen Rezeptor	AQ <b>p</b> YSMLATW
Epo-Rezeptor	LK <b>p</b> YLYLVVS
G6b-B Protein von MHCIII	LL <b>p</b> YADLDHL , TI <b>p</b> YAVVV
Gab-2	VD <b>p</b> YLALDFQ, VD <b>p</b> YVQVDKE
IL-3 Rezeptor	LE <b>p</b> YLCLPAG
IL-4 Rezeptor	IV <b>p</b> YSALTCH
Immunoglobulin-like Transkript 2(LIR-1)	VT <b>p</b> YAQLHSL , SI <b>p</b> YATLAIH
Immunoglobulin-like Transkript 3(LIR-5)	VT <b>p</b> YAKVKHS , VT <b>p</b> YAQLHSF
Killer-Zellen Ig-like Rezeptor 2DL1(p58,NKAT-1)	VT <b>p</b> YTQLNHC , IV <b>p</b> YTELPNA
Lektin-like Immunorezeptor	IT <b>p</b> YAEVRFK
Leukocyten Antigen (CD84)	TI <b>p</b> YTYIMAS , TV <b>p</b> YSEVQFA
Antigen-Rezeptor natürlicher Killer-T- und B-Zellen	LE <b>p</b> YVSVSPT , TV <b>p</b> YASVTHS,
Ros	LN <b>p</b> YMV LATE, LN <b>p</b> YACLAHS
Sialinsäure bindendes Ig-like Lektin-2 (CD22)	VT <b>p</b> YSALHKR, IH <b>p</b> YSELIQF
Sialinsäure bindendes Ig-like Lektin-3 (CD33)	LH <b>p</b> YASLNFH, TE <b>p</b> YSEVRTQ
SIGLEC-10	LD <b>p</b> YINVVPT , LH <b>p</b> YATL NFP,
STAT 5	LN <b>p</b> YLIYVFP, DG <b>p</b> YVKPQIK
PD-1	TE <b>p</b> YATIVFP

## 4. Peptidsynthese

Die Synthese der gegen den proteolytischen Abbau geschützten und gleichzeitig konformationell stabilisierten Peptid-Liganden mit Phosphotyrosin stellt hohe Anforderungen an die Peptidsynthese. Erfordert bereits der Einbau konformationstabilisierter Aminosäuren besondere Aktivierungsmethoden, so erhöhen Zyklisierung und besonders die Rückgratzyklisierung in Kombination mit der Phosphorylierung den Schwierigkeitsgrad beträchtlich. Um bei den komplizierten Syntheseschritten noch hinreichende Ausbeuten zu erreichen, erfolgte der Aufbau der Oktapeptide an der festen Phase.

### 4.1 Wahl der Harze und Schutzgruppen

Das Konzept der Festphasensynthese wurde erstmals 1963 von Merrifield in der Peptidsynthese verwendet. Als feste Phase dienen dabei quervernetzte Polystyren-Harze. Aber auch Polyethylen, Polyacrylamid sowie Kieselgur und poröse Glasperlen kommen zum Einsatz. Der polymere Träger enthält sogenannte Linker, welche die Anknüpfung und spätere Abspaltung der Aminosäuren und Peptide ermöglichen. Neben dem chlormethylierten Merrifield-Harz und dem mit langen Polyethylenglykol-Ketten versehenen Tentagel-Harz kommen besonders das Wang-Harz mit einer terminalen Hydroxy-Gruppe sowie das Rink-Amid-Harz mit einer Amino-Gruppe zum Einsatz. Das säurelabile Rink-Amid-MBHA-Harz besteht aus einem modifizierten Rink-Amid-Linker, der über Norleucin (Nle) an das MBHA (4-Methyl benzhydrylamin)-Harz gekoppelt ist.

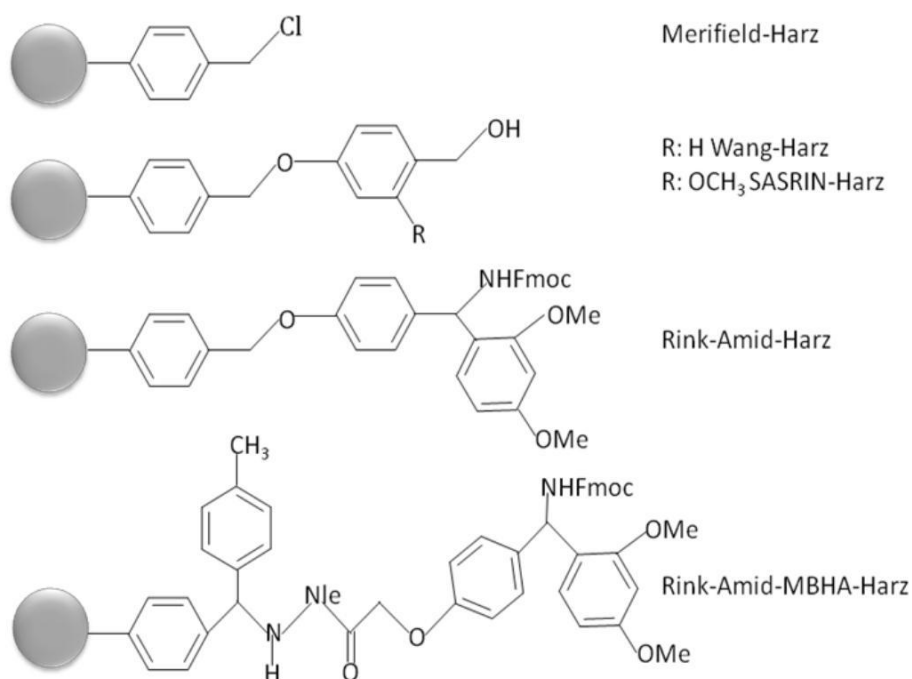


Abb. 8 Verschiedene Harze für Festphasensynthese.

Die Festphasensynthese besitzt den Vorteil, dass gelöste Reaktanden oder Reagenzien in großem Überschuss eingesetzt werden können, was im Normalfall zu einer vollständigen und bei schwierigen Schritten durch wiederholte Kopplungen zu einer hinreichenden Umsetzung führen kann. Die eingesetzten Überschüsse an Aminosäurederivaten und Aktivierungsreagenzien können nach beendeter Reaktion leicht durch mehrfaches Waschen der Festphase entfernt werden. Dadurch entfallen mühevollere Reinigungsschritte, die bei der „Lösungs-Synthese“ erforderlich sind. Zu den Vorteilen der Festphasensynthese zählt auch die einfache Abspaltung des fertigen Peptides oder Proteins vom gründlich gewaschenen Harz. Diese sich immer wiederholenden Schritte prädestinieren die Festphasensynthese für die Automatisierung. Diese ist aber nur bei den Synthesen mit wenig anspruchsvollen Aminosäuren möglich. Bei dem Aufbau komplizierter Peptide, wie in der Arbeit beschrieben, muss jeder Schritt analytisch untersucht werden, was eine Automatisierung ausschließt.

Die Einführung der 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc-Gruppe) durch Carpino [148] hat die Festphasen-Synthese wesentlich bereichert. Sie ermöglicht eine orthogonale Schutzgruppen-Strategie, bei der die basenlabile Fmoc-Gruppe den N-Terminus schützt und am Ende jedes Zyklus mit einem sekundären Amin (z.B. Piperidin) abgespalten wird, während die säurelabilen Schutzgruppen die funktionellen Gruppen der Seitenketten schützen und erst am Ende der Synthese, oft mit Trifluoressigsäure, entfernt werden. Als säurelabile Seitenketten-Schutzgruppen kommen beispielsweise die tert.-Butyloxycarbonyl- (Boc), die tert.-Butyl- ( $\text{Bu}^t$ ) oder die Trityl-Gruppe (Trt) zur Anwendung. Darüber hinaus haben wir noch Schutzgruppen vom Allyl-Typ angewandt, die durch milde Pd(0)-katalysierte Allyl-Übertragung auf einen nukleophilen Fänger (z. B. Morpholin) abgespalten werden [149].

## 4.2 Aktivierung der Carboxylgruppe der Aminosäure

Die Anknüpfung der nachfolgenden Aminosäure an den entschützten *N*-Terminus eines Peptides sollte möglichst quantitativ und ohne Razemisierung chiraler Aminosäuren erfolgen. Zur Aktivierung der Carboxylgruppe einer Aminosäure können Carbodiimide oder alternative Aktivierungsreagenzien eingesetzt werden. So können Aminosäuren mit HOBt in situ mit Kopplungsreagenzien in Aktivester umgewandelt werden, die nur eine geringe Anfälligkeit für Razemisierungen haben [150]. Das analoge Additiv HOAt wurde von Carpino entwickelt [151], seine Ester sollen eine höhere Aktivität besitzen. Aktivester lassen sich auch mit Aminium- (HATU, HBTU, HCTU), Uronium- (HDTU, HDATU) oder Phosphonium-Kopplungsreagenzien (PyAOP, PyBOP) in Anwesenheit einer Base erzeugen. Neben diesen

Aktivierungsreagenzien gibt es noch eine Vielzahl weiterer Aktivierungsmethoden. Die Wahl des einzusetzenden Aktivierungsreagenz ist immer von der Zielstellung der Peptidsynthese (z.B. Aminosäuresequenz, angestrebte Kopplungsausbeute) und den entstehenden Kosten abhängig [152]. Eine besondere Stellung in der Peptidsynthese nehmen die Pentafluorphenyl (OPfp)-Ester ein. Sie kommen bei der Ankondensation an die wachsende Peptidkette ohne weitere Zusätze aus. Sie sind stark aktiviert, aber trotzdem in kristalliner Form sehr stabil und fast unbegrenzt lagerfähig. Ihrer hohen Reaktions-Ausbeuten und der einfachen Handhabung wegen [153, 154], wurden sie von uns zum Aufbau der Peptide eingesetzt. Eine noch stärkere Aktivierung der Carboxylgruppen kann durch Umwandlung in die entsprechenden Säurefluoride oder -chloride erfolgen. N-geschützte Aminosäuren können in einfachen Reaktionen mit TFFH in die entsprechenden Fluoride oder mit BTC in die Chloride umgewandelt werden [155, 156]. Wenn man die generierten Aminosäurefluoride isolieren will, werden sie dazu am besten mit Cyanursäurefluorid oder DAST hergestellt [157, 158]. Da die Aminosäurechloride zu Instabilität und Razemisierung neigen, werden sie trotz ihrer hohen Reaktivität weniger angewandt. In unseren Synthesen war die sterisch gehinderte Ankopplung einer geschützten Aminosäure an ein am Amino-Stickstoff alkyliertes Aminosäurederivat sehr schwer durchzuführen. Deshalb haben wir diesen Schritt sowohl mit Säurefluoriden als auch mit Säurechloriden erprobt.

### **4.3 Nebenreaktionen**

Bei der Peptidsynthese gibt es eine ganze Reihe von Nebenreaktionen, die abhängig von Sequenz und verwendeten Reagenzien auftreten können. Zu den für die vorliegende Sequenz relevanten Nebenreaktionen gehören die Aspartimidbildung, die N-Guanylierung und die Razemisierung. Durch eine geeignete Reaktionsführung muss auf diese Nebenreaktionen Rücksicht genommen werden.

#### **4.3.1 Aspartimidbildung**

Peptide mit Aspartat und Asparagin neigen zur Bildung zyklischer Imide [159]. Diese können bei der Entfernung basenlabiler Schutzgruppen mit Piperidin oder bei der säurekatalysierten Abspaltung der Peptidsequenz vom Harz entstehen.

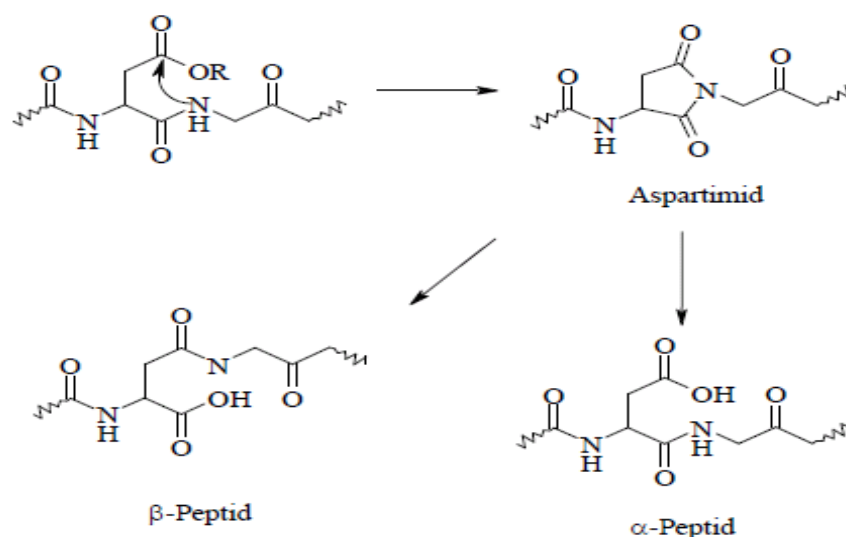


Abb. 9: Mechanismus der Bildung des Aspartimids und seiner Öffnung zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptiden

Die Hydrolyse des Aspartimids ergibt eine Mischung aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptiden (Abb. 9). Zur Vermeidung der basenkatalysierten Aspartimidbildung wird an Stelle von Piperidin die Verwendung einer 6 %igen Lösung von Piperazin in DMF vorgeschlagen [96].

#### 4.3.2 N-Guanylierung

Bei der Ankondensation einer sterisch gehinderten Aminosäure oder bei der Ankondensation an eine wenig reaktionsfähige Aminosäure, z.B. an eine N-Alkyl-Aminosäure, können Aktivierungsreagenzien auf der Basis von Uronium- oder Guanidinium-Strukturen mit der N-terminalen Aminogruppe reagieren (Abb. 10). Dabei werden Guanidinium-Derivate gebildet. Diese Nebenreaktion wurde auch bei der Zyklisierung linearer Peptide beobachtet [160].

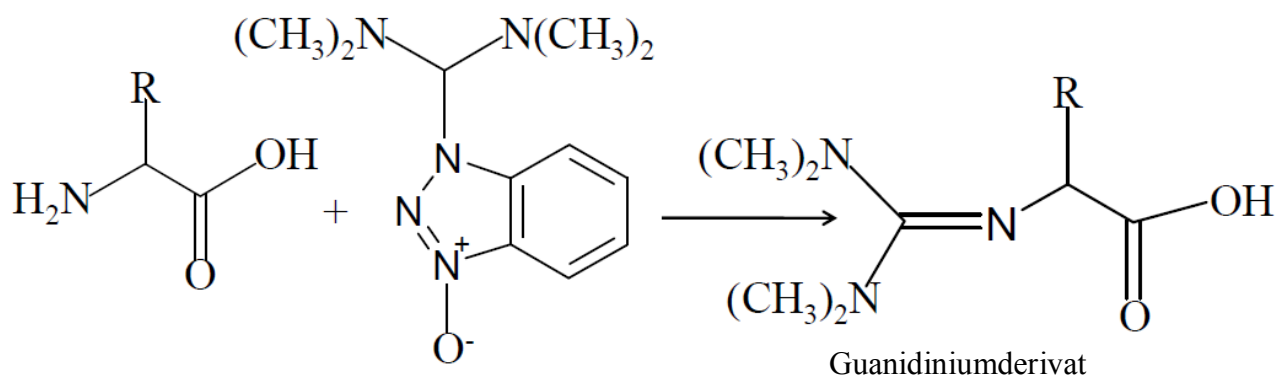


Abb. 10: Tetramethyl-Guanylierung des Aminoterminus

### 4.3.3 Razemisierung

Da die meisten Aminosäuren ein oder zwei chirale Zentren enthalten, besteht bei der Aktivierung der Carboxyl-Gruppe die Gefahr des Verlustes der chiralen Integrität. Um dieser generellen Gefahr bei der Peptidsynthese vorbeugen zu können, wurden die Mechanismen der Razemisierung ausgiebig untersucht. Man kann zwei Mechanismen unterscheiden, die basenkatalisierte Enolisierung und die Oxazolon-Bildung.

#### a) Enolisierung

Bei Carboxy-aktivierten Derivaten kann im Gleichgewicht ein Carbanion ausgebildet werden, das zu einem partiellen Verlust der Stereochemie führen kann, da die Reprotonierung ohne Stereoselektivität abläuft.

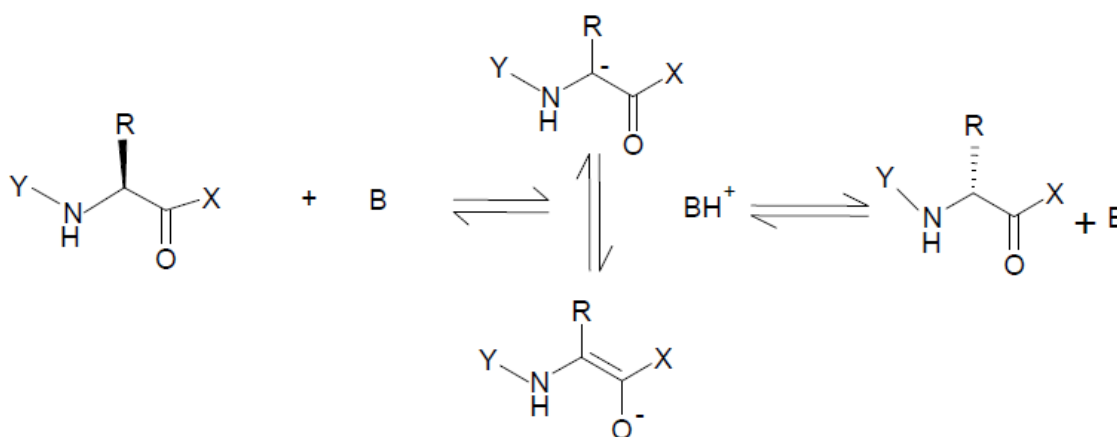


Abb. 11: Mechanismus der basenkatalysierten Razemisierung

#### b) 5(4H)-Oxazolonbildung:

Dieser Reaktionsmechanismus tritt vorwiegend bei solchen Peptidkopplungen auf, die des Zusatzes von Basen bedürfen. Die Abspaltung des Amidprotons durch eine Base führt zu einem Amid-Anion (**1b**), durch dessen nukleophilen Sauerstoff der Ringschluß zum Oxazolon erfolgt.



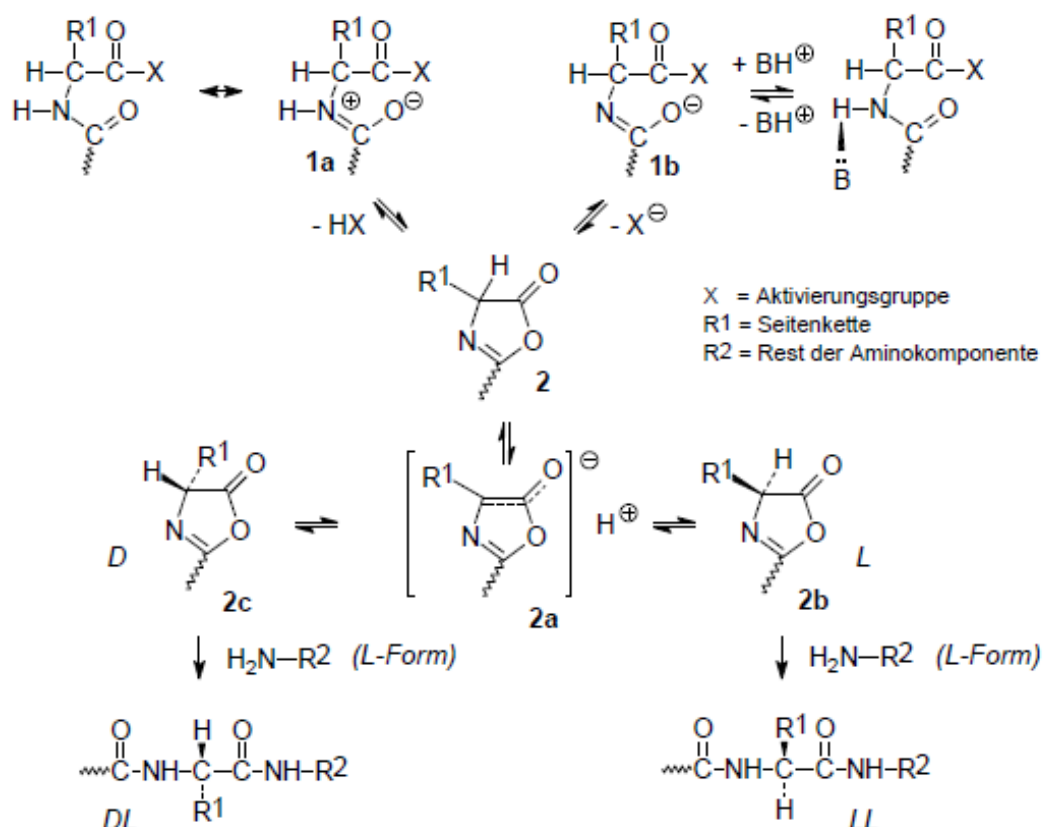


Abb. 12: Racemisierung durch 5(4H)-Oxazolonbildung

Das gebildete 5(4H)-Oxazolon (auch als 2-Oxazolin-5-on oder Azlacton bezeichnet) ist durch die Delokalisation der Elektronen stereochemisch labil. Die Tendenz zur Ausbildung des Oxazolons hängt von dem Potential des Aktivierungsreagenzes und von den elektronischen Eigenschaften des *N*-Acylrestes ab. Acetyl- und Benzoyl-Reste favorisieren die Ausbildung von Oxazolonen. Dabei wird durch stark Elektronen-ziehende Substituenten *X* das C-Atom der Carboxyfunktion positiviert, wodurch der intramolekulare nukleophile Angriff an das aktivierte Carbonyl-Sauerstoff-Atom begünstigt wird. Urethan-Schutzgruppen wie Z-, Boc- oder Fmoc-Gruppen besitzen nur eine geringe Razemisierungstendenz. Ist der Aminostickstoff des aktivierten Restes durch *N*-Acylgruppen oder mit einer Peptidkette acyliert, wird die Zyklisierung zum Oxazolon erleichtert. Das ist der Fall bei der Ankondensation von Pseudodipeptiden. Das Oxazolon kann nach Wasserstoff-Abstraktion über eine anionische pseudoaromatische Zwischenstufe in einem basenkatalysierten Gleichgewicht die beiden stereoisomeren Formen L (**2b**) und D (**2c**) bilden, die anschließend durch die Aminokomponente geöffnet werden können.

#### 4.4 Zyklische Peptide

Peptiden können auf unterschiedliche Weise zyklisiert werden. Auf der Grundlage der vermeintlichen bioaktiven Konformation kann der Ringschluss zwischen verschiedenen funktionellen Gruppen innerhalb der Peptidsequenz durchgeführt werden. Viele zyklische Peptide sind *homodet*, d.h. sie enthalten nur Peptidbindungen (Laktame), andere sind *heterodet* und weisen neben Peptidbindungen zusätzlich Ester-(Laktone), Disulfid-, Thioether- oder Thioester-Bindungen auf. Der Vorteil der Zyklisierung am Harz ist die Möglichkeit, durch hohe Überschüsse an Aktivierungsreagenz die Zyklisierungsreaktion zu begünstigen und die im Überschuss eingesetzten Reagenzien durch wiederholte Waschschrte unter Einsatz unterschiedlicher Lösungsmittel weitgehend zu entfernen. Der Gefahr der intermolekularen Zyklisierung wird durch niedrige Harzbeladungen begegnet. Der Syntheseweg für rückgratzyklisierte Peptide ist schwieriger als für die Zyklisierung über die Seitenketten oder zwischen N- und C-Terminus.

#### 4.5 Rückgratzyklisierung

Um die für die Wechselwirkung mit den biologischen Bindeproteinen notwendigen Seitenketten sowie N- und C-Terminus intakt zu lassen, kann auch eine Zyklisierung über das Peptidrückgrat erfolgen. Dazu muss das Rückgrat mit solchen funktionellen Gruppen versehen werden, die eine Zyklisierung erlauben. Meist werden die Amid-Stickstoffe mit Alkyl-Gruppen substituiert, die an ihren Enden zur Ringbildung geeignete Gruppen tragen. Das können SH-, Alkylene, Amino- oder Carboxyl-Gruppen sein. Die Zyklisierung kann dann über die Bildung von Disulfid- oder Laktam-Brücken erfolgen [6, 161]. In dieser Arbeit wurden Amino-Alkyl-Reste in das Rückgrat eingebaut. Da die Ankondensation von geschützten Aminosäuren an N-Alkyl-Aminosäuren oder Peptide nur sehr unvollständig verläuft, werden die entsprechenden Pseudodipeptid-Einheiten vorgefertigt. Das kann sowohl in Lösung mit anschließender chromatographischer Reinigung als auch an der festen Phase unter Einsatz eines großen Überschusses an anzukoppelnder Aminosäure erfolgen. Diese beiden Strategien werden im Folgenden ausführlicher beschrieben.

##### a) *Synthese in Lösung:*

Die Methode der Rückgratzyklisierung wurde erstmals von Gilon et al. angewandt [162]. Die dabei zur Darstellung der N-funktionalisierten Aminosäure-Derivate verwendete Triflat-Methode war nicht sehr effektiv. Sie wurde in der Jenaer Arbeitsgruppe durch die reduktive Alkylierung ersetzt. Diese Methode ist einfacher in der Handhabung und breiter anwendbar.

Sie erfordert die Darstellung der entsprechenden Aldehyde. Dazu werden Weinreb-Amide [163] mit Lithium-Aluminium Hydrid nach Fehrentz & Castro reduziert [164].

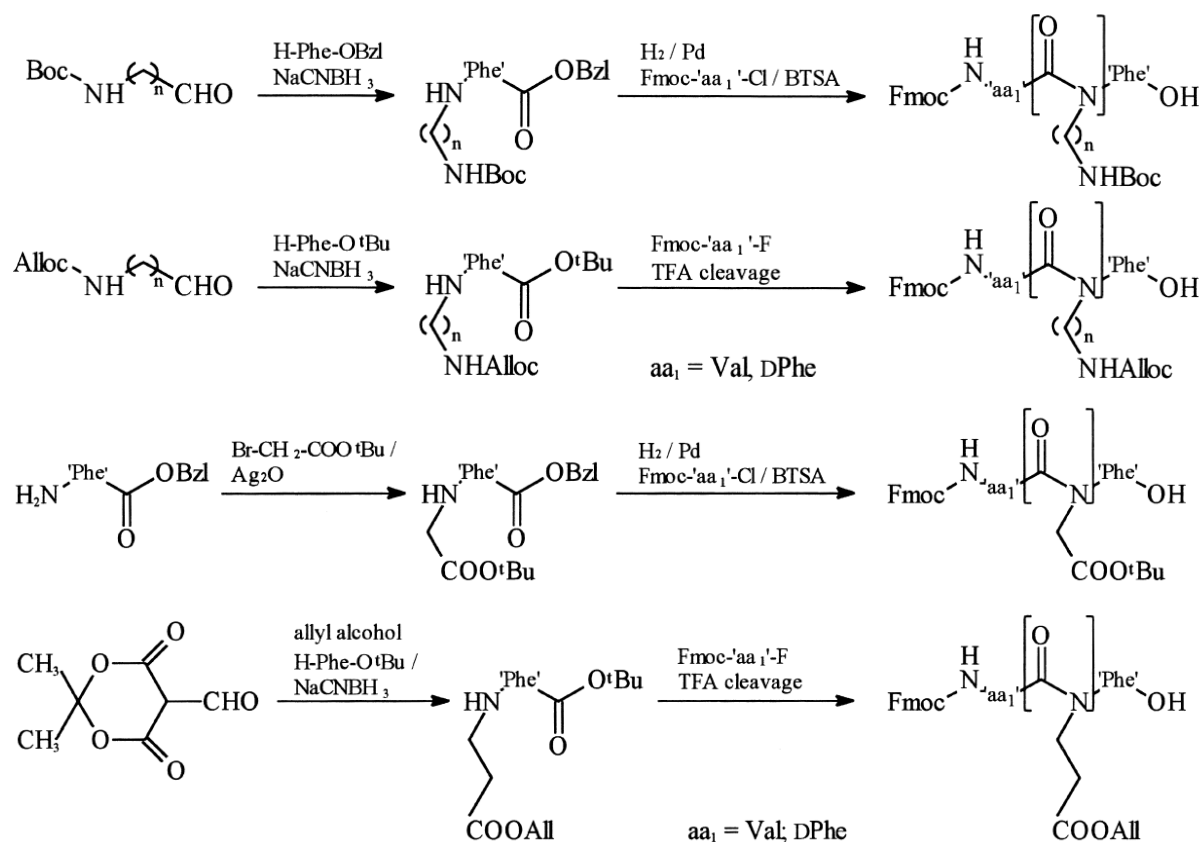


Abb.13: Synthesestrategien für N-funktionalisierte Aminosäuren [165]

Zur Darstellung einer N-Carboxyethyl-Gruppe kann auch ein Bromessigsäure-Derivat oder Formylmeldrumsäure eingesetzt werden. Diese Strategien zur Darstellung von N-Aminoalkyl- und N-Carboxyalkyl-aminosäuren sind in Abbildung 13 zusammen gestellt.

Nach Müller et al. [165] können die zur Rückgratzyklisierung notwendigen Pseudodipeptide durch Ankondensation von Fmoc-Aminosäure-Chloriden oder -Fluoriden an die N-funktionalisierten Aminosäure in guter Ausbeute und Reinheit erhalten werden.

#### b) Synthese am Harz

Schwierig zu erhaltende Bausteine können auch am Harz dargestellt werden, weil dann Mehrfachkopplungen zur Vervollständigung des Umsatzes möglich sind. Als besonders geeignet haben sich das Wang-, das 2-Chlortrityl-Chlorid- und das SASRIN-Harz erwiesen, weil von diesen Harzen geschützte Dipeptid-Bausteine mit freier Carboxyl-Gruppe gewonnen werden können. Die Synthese kann sowohl durch Ankondensation der Fmoc-Aminosäure oder der Fmoc-geschützten N-Alkylaminosäure (I) an das Harz durchgeführt werden. Im

ersteren Falle erfolgt die reduktive Alkylierung unter Verwendung eines geschützten Aldehydes am Harz (II). Die Ankondensation der folgenden Aminosäure an die Harzgebundene N-Alkyl-Aminosäure ist im Falle sperriger und wenig reaktionsfähiger Aminosäuren schwierig. Die besten Ergebnisse wurden dabei mit N-geschützten Aminosäurefluoriden erreicht [166]. Abbildung 14 gibt die Wege I und II wieder.

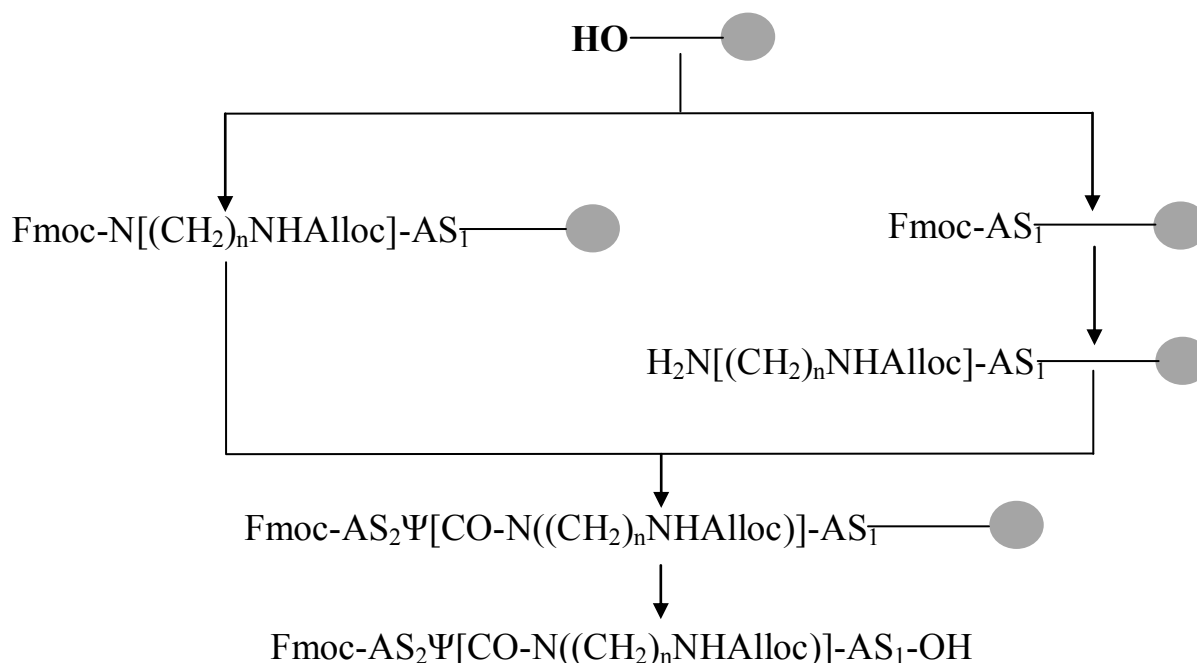


Abb. 14: Festphasesynthese von Pseudodipeptiden am Harz

Die in Lösung oder an der Festphase vorgeformten Pseudodipeptide können in gleicher Weise wie andere Aminosäure mit PyBop an die wachsende Peptidkette ankondensiert werden. Da bei der Kopplung von Dipeptiden, vor allem solchen mit C-terminaler N-Alkyl-aminosäure, mit Razemisierung, gerechnet werden muss, wurden diese Reaktionen sorgfältig untersucht. Die Razemisierungsgefahr kann durch entsprechende Reaktionsführung verringert, aber nicht ausgeschlossen werden. Dazu gehört der Ersatz der Base DIPEA durch Collidin [5].

#### 4.6 Phosphorylierung der Peptide

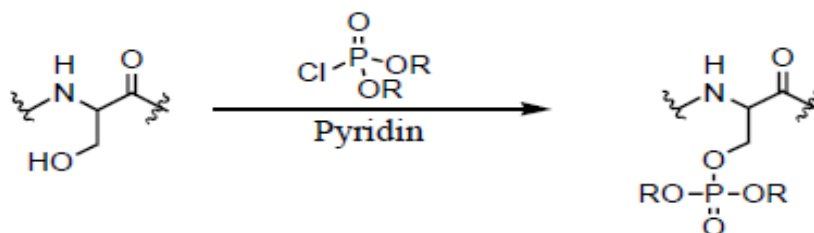
Phosphopeptide können durch zwei allgemeine Methoden synthetisiert werden: Das sind einerseits die Bildung und der Einbau von phosphorylierten Bausteinen und andererseits die globale Phosphorylierung. Die Strategie für die Synthese der phosphorylierten Aminosäure- bzw. Peptid-Bausteine besteht aus einem Drei-Stufen-Prozess:

- temporärer Schutz der Carboxyl-Gruppe einer N<sup>α</sup>-geschützten Aminosäure oder eines Dipeptides
- Phosphorylierung der freien Hydroxyl-Gruppe in der Seitenkette
- selektive Abspaltung der Schutzgruppe von der der Carboxyl-Gruppe.

Zur Phosphorylierung werden hauptsächlich zwei Methoden angewandt:

die Phosphorchloridat- und die Phosphoramidit-Methode. Bei der Phosphorchloridat-Methode wird die geschützte Aminosäure bzw. das geschützte Peptid mit dem Phosphorsäure-esterchlorid in Pyridin direkt zum entsprechenden Phosphat-Ester umgesetzt [167]. Nach der Phosphoramidit-Methode wird das geschützte Peptid bzw. die Aminosäure zuerst mit dem Phosphoramidit zum Phosphit-Ester umgesetzt, der dann *in situ* zum Phosphat oxidiert wird (Abb. 15) [168].

#### Phosphorchloridat-Methode:



#### Phosphoramidit-Methode:

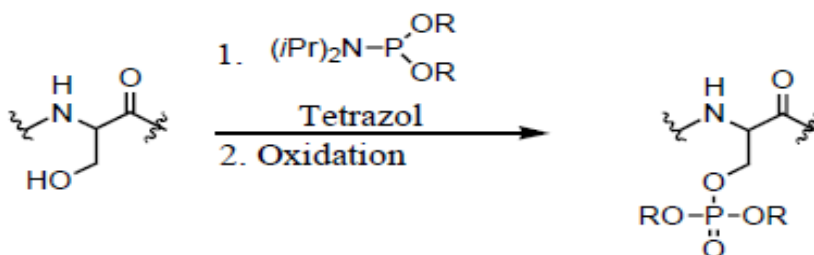


Abb. 15: Phosphorylierungsmethoden

Befinden sich im Peptid keine oxidationsempfindlichen Aminosäuren, ist die Phosphoramidit-Methode auf Grund ihrer kürzeren Reaktionszeiten und den besseren Ausbeuten der Phosphorchloridat-Methode vorzuziehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich die Phosphoramidit-Methode verwendet. Andrews et al. [169] haben am Beispiel von 6 Peptiden gezeigt, dass durch die globale Phosphorylierung mit Di-benzyl-[N,N-diisopropylphosphoramidit] eine höhere Qualität der Produkte erreicht werden kann als durch den Einsatz von phosphorylierten Blöcken. Dieses Ergebnis kann nicht verallgemeinert werden, spricht aber für die in der Arbeit angewandte Methode.

#### **4.7 Peptidsynthesen mit der Mikrowelle**

In den letzten zehn Jahren wurden Mikrowelle-Synthesen zur Beschleunigung von Reaktionen in der organischen Synthese vielfach eingesetzt. Es konnten dabei eine bis zu 1000fache Beschleunigungen erreicht werden. Im Gegensatz zur konventionellen Reaktionsdurchführung unter Erwärmung aktiviert die Mikrowellen-Energie direkt alle Moleküle mit Dipolmoment und ermöglicht so eine schnelle Erwärmung auf der molekularen Ebene. Die Mikrowelle wurde ebenfalls erfolgreich in der Peptidsynthese eingesetzt, um höhere Ausbeuten bei den Kopplungsreaktionen zu erreichen. So konnte von vielen Autoren gezeigt werden, dass die Ausbeuten bei den mit der Mikrowelle unterstützten Synthesen höher waren. Park et al. [170] haben gezeigt, dass auch die für die Darstellung von Pseudodipeptiden notwendige reduktive Alkylierung mit Mikrowellenstrahlung höhere Ausbeuten liefert.

## 5. Zielstellung

Peptide sind effektive und sehr selektive Wirkstoffe. Ihre therapeutische Anwendung erfordert in vielen Fällen eine Stabilisierung gegen den enzymatischen Abbau. Eine sehr effektive Methode dafür ist die Rückgrat-Zyklisierung. Sie belässt die zur Wirkungsauslösung erforderlichen Seitengruppen unverändert und kann die biologisch aktive Raumstruktur formen. Für bi- und auch einige trifunktionelle Aminosäuren wurde diese Methode bereits beschrieben, jedoch nicht für Tyrosin (Y) bzw. phosphoryliertes Tyrosin (pY). Für die Beeinflussung der intrazellulären Signaltransduktion sind aber Peptide mit Y bzw. pY als Substrate oder Inhibitoren von Protein-Kinasen und -Phosphatasen sowie als Liganden für SH2- und PTB-Domänen von entscheidender Bedeutung. Die Darstellung von Y- bzw. pY-Peptiden mit Rückgrat-Zyklisierung ist deshalb von allgemeinem Interesse und soll in dieser Arbeit an Oktapeptid-Liganden für die N-terminale SH2-Domäne der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 erprobt werden.

Die besondere Herausforderung besteht darin, entsprechend einem modellierten allgemeinen Liganden die Laktam-Brücke am Stickstoff des Phosphotyrosins starten zu lassen. Dazu müssen sowohl Pseudo-Dipeptidbausteine mit der trifunktionellen Aminosäure Tyrosin dargestellt als auch eine geeignete Strategie zum Aufbau der rückgratzyklisierten und gleichzeitig auch phosphorylierten Oktapeptide entwickelt werden. Die erhaltenen Liganden sollen auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung der Phosphatase SHP-1 untersucht werden. Der angestrebte Erkenntnisgewinn besteht vor allem in der Entwicklung von Synthesestrategien für den Aufbau rückgratzyklisierter Peptide mit Phosphotyrosin. In die Laktam-Brücke sollen aliphatische Reste unterschiedlicher Länge sowie aromatische und zykoaliphatische Reste eingebaut werden, um über Struktur-Wirkungsbeziehungen die strukturellen Anforderungen an Liganden für SH2-Domänen besser verstehen zu lernen. Außerdem soll die Auswertung der experimentell ermittelten Aktivitäten zur Überprüfung und Verfeinerung der Docking-Modelle genutzt werden.

## 6. Material und Methoden

### 6.1 Materialien

#### *Aminosäuren, Aminosäurederivate und Harze*

#### Firma

Boc-Glu(OBu <sup>t</sup> )-OH	Novabiochem
Fmoc-8-amino-3,6 dioxaoctansäure	Neosystem
Fmoc-Abu(βPh)-OH	Arbeitsgruppe Reißmann
Fmoc-Abu-OH	Novabiochem
Fmoc-Asn(Dmcp)-OH	Novabiochem
Fmoc-Asn(Trt)-OH	Novabiochem
Fmoc-Asp-OBu <sup>t</sup>	Orpegen
Fmoc-Glu(OBu <sup>t</sup> )-OPfp	Novabiochem
Fmoc-Gly-OPfp	Novabiochem
Fmoc-Leu-OH	Novabiochem
Fmoc-Leu-OPfp	Novabiochem
Fmoc-Lys(Alloc)-OH	Bachem
Fmoc-Nle-OH	Novabiochem
Fmoc-Ser(βPh)-OH	Arbeitsgruppe Reißmann
Fmoc-Tyr[PO(OBzl)OH]	Novabiochem
Fmoc-Val-OH	Novabiochem
H-γ-Abu-OH	Aldrich
H-Ava-OH	Aldrich
H-ε-Ahc-OH	Aldrich
H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -COOH. HCl	Aldrich
H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> -COOH	Aldrich
H-Tyr(Bu <sup>t</sup> )-OBu <sup>t</sup> HCl	Novabiochem
H-Tyr(But)-OH	Novabiochem
2-Cl-Trityl-Chlorid-Harz	Novabiochem
Rink-Amid-MBHA-Harz	Novabiochem
SASRIN-Harz	Bachem

#### *Reagenzien zur Synthese, Kopplung und Abspaltung*

#### Firma

(Boc) <sub>2</sub> O	Fluka
----------------------	-------



---

DIPEA	Fluka
DBU	Fluka
DCM	Mineralöle Albert
Diethylether	Acros
DMF	Acros
HBTU	Novabiochem
HOAt	Biosystem
HOBt	IRIS
MeOH (zur Peptidsynthese)	Acros
Piperidin	Fluka
PyAOP	Novabiochem
PyBOP	Novabiochem
PyBrOP	Novabiochem
TEA	Fluka
Tetrakis(Triphenylphosphin)-Palladium	Aldrich
TFA	Acros
TFFH	IRIS
TIS	Fluka
Natriumorthovanadat, 99,98%	Sigma-Aldrich

---

*Enzyme, Puffer und Transduktionscocktail*

Firma

---

Chymotrypsin	Sigma-Aldrich
Homogenat der NIH 3T3-Zellen	Jena Bioscience GmbH
Proteinase K from Tritirachium album	Quiagen
SHP-1 (human, recombinant)	Enzo Life Sciences GmbH
Puffer	
Dulbeccos PBS (1x) ohne Ca und Mg	PAA (The Cell Culture Company), Pasching, Österreich
HEPES PUFFERAN, 99,5%	Carl Roth
Phosphatase-Testkit	Jena Bioscience GmbH
JBS-Proteoducin	Jena Bioscience GmbH

## 6.2 Chemische Charakterisierung der Peptide

### 6.2.1 Dünnschichtchromatographie

Für die Untersuchungen wurden Kieselgel 60 F254 Glasplatten (MERCK) eingesetzt und die nachfolgenden Laufmittelsysteme für geschützte und freie Peptide verwendet:

System 1: Chloroform:Methanol 9:1 (v/v).

System 2: n-Butanol:Eisessig:Wasser 4:1:1 (v/v/v).

System 3: Benzol:Aceton:Eisessig 27:10:0,5 (v/v/v).

System 4: Essigester:Hexan 9:1 (v/v).

System 5: n-Propanol:Ammoniak 7:3 (v/v).

System 6: n-Butanol:Eisessig:Wasser : 48:18:24 (v/v/v)

System 7: Pyridine:Essigester:Eisessig:Wasser : 5:5:1:1 (v/v/v/v)

Die Durchführung erfolgte mit frisch bereiteten Laufmitteln, in gesättigten Kammern bei Raumtemperatur. Die Detektion erfolgte mittels UV(254)-Licht und/oder Ninhydrin und Chlor/Tolidin-Färbung.

### 6.2.2 Flash-Chromatographie

Diese Methode wurde zur Reinigung der synthetischen Fmoc-geschützten Aminosäurederivate und Pseudodipeptide eingesetzt. Als Adsorptionsmittel wurde Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm) der Firma MERCK verwendet. Der Durchmesser der verwendeten Fritte betrug 10,4 cm, die Höhe der darin befindlichen Kieselgelschicht 6 bis 7 cm. Das zur Elution verwendete Lösungsmittelgemisch ist bei den entsprechenden Synthesevorschriften angegeben.

### 6.2.3 Analytische HPLC

Die HPLC-Analyse der Aminosäurederivate und Peptide erfolgten an einer LC 10 AT-Anlage der Firma Shimadzu (System I), an einer PU-987-Anlage der Firma JASCO (System II) ausgestattet mit einer Vydac 218TP-Säule (25 x 4,6 mm, 300 Å Porengröße, 5µm Korngröße) oder an einer Shimadzu-HPLC-Anlage 10 A , ausgestattet mit einer ProntoSil-Säule (C18, 5µm, 250 x 4,6 mm) unter Nutzung eines Triethylammoniumacetat-Acetonitril Gradienten (A = 0,1 M Triethylammoniumacetat, 0-100% B, B = 30% A + 70% Acetonitril, Detektion bei 234 nm; System III). Für die Elution wurden je nach Analysenprobe bei den Systemen I

und II unterschiedliche Gradienten gewählt. Das verwendete System und der jeweils verwendete Gradient sind in den Daten zur Charakterisierung der Substanzen aufgeführt.

Eluent A: 0,1%TFA in Wasser

Eluent B:0,1%TFA in Acetonitril

Flussrate:1ml/min

Detektion: 220 nm

Gradient 1                      00% - 80% Eluent B in 80 min    Detektion 220 nm

Gradient 2                      20% - 80% Eluent B in 60 min    Detektion 220 nm

Gradient 3                      10% - 70% Eluent B in 60 min    Detektion 220 nm

#### 6.2.4 Semipräparative HPLC

Die Rohprodukte der linearen Peptide wurden an einer LC-8A-Anlage (Shimadzu), ausgestattet mit einer Eurospher 100-Säule (Firma Knauer, C18, 250 x 32,5 100 Å Porengröße, 5 µm Korngröße) getrennt. Für die Trennung wurden folgende Bedingungen ausgewählt:

Eluent A: 0,1% TFA in Wasser

Eluent B: 0,1% TFA in 90% Acetonitril/Wasser

Flussgeschwindigkeit: 8 ml/min

Detektion bei 220 nm

Gradient: 15% - 65% Eluent B in 120 min

Die Rohprodukte der linearen und zyklischen Oktapeptide wurden an einer JASCO-Anlage getrennt, ausgestattet mit einer Vydac-Säule 218 TP-1010 (100 x 10mm, 300 Å Porengröße, 5 µm Korngröße).

Eluent A: 0,1% TFA in Wasser , Eluent B: 0,1% TFA in Acetonitril

Flussgeschwindigkeit: 6 ml/min, Detektion: 220 nm

Gradient: 15% - 65% Eluent B in 120 min

Die Fraktionen wurden manuell gesammelt und lyophilisiert.

#### 6.2.5 Massenspektrometrie

##### *ESI-MS*

Die Peptide wurden mit einem ESI-Massenspektrometer (TSQ-Quantum von Thermo Fischer AM) gemessen.

##### *MALDI-MS*

Die Peptide wurden mit einem Laser-Tec Research Massenspektrometer (Perspective Biosystems) als Flugzeitspektren (MALDI-TOF) analysiert. Als Matrix diente  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizinsäure. Als Lösungsmittel wurde 0,1% TFA in Acetonitril/Wasser (1:1) verwendet

### **6.2.6 NMR-Spektroskopie**

Die Proben wurden in DMSO-D<sub>6</sub> als Lösungsmittel gelöst. Die <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden bei 400 MHz mit einem Brucker-Gerät (AVANCE 400 MHz) aufgenommen.

### **6.2.7 Einsatz der Mikrowelle**

Die Ankondensation von Fmoc-Aminosäuren an N-Alkyl-Tyrosin-Derivate wurde unter Verwendung eines CEM-Gerätes durchgeführt.

## 6.3 Methoden

### 6.3.1 Synthesen der Pseudodipeptide in Lösung

„wie üblich aufgearbeitet“: Lösen der Substanz in Essigester und Ausschütteln mit NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. (3x), NaCl-Lsg. (1x), KHSO<sub>4</sub>-Lsg. (3x) und NaCl-Lsg. (3x), Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Einengen i. Vak.

#### Synthese von Fmoc-AbuΨ[CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH **6**

*Synthese von Alloc-β-Ala-OH 1 (Methode A) [165]*

Die Aminosäure H-β-Ala-OH (1,1 Äqu., 2,8 g) wird in einer konzentrierten Natriumcarbonatlösung (30-45 ml) gelöst. Die Lösung wird auf 0° C abgekühlt. Man lässt Alloc-Cl (1,0 Äqu., 3ml) innerhalb von 2 Stunden so zutropfen, dass die Lösung immer basisch bleibt. Die klare Lösung wird 30 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend dreimal mit Äther extrahiert, um überschüssiges Alloc-Cl zu entfernen. Die wässrige Lösung wird auf 0°C gekühlt und unter starkem Rühren mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 1-2 eingestellt. Die saure Lösung wird mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit 1N HCl gewaschen und anschließend mit gesättigter NaCl-Lösung neutral gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird die Lösung filtriert und i. Vak. eingengt. Man erhält ein farbloses Öl. 4,4 g, R<sub>f</sub> 0,35 (S1); 0,50 (S2); 0,25 (S3).

*Alloc-β-Ala-N(CH<sub>3</sub>)-OCH<sub>3</sub> 2 (Methode B) [165]*

Alloc-β-Ala-OH **1** (1 Äqu., 4,43 g) und N,O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (1,1 Äqu., 2,7 g) werden in 70 ml Dichlormethan gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend werden DIPEA (1,1 Äqu., 4,80 ml) und DCC (1 Äqu., 5,28 g) zugegeben, 1 Stunde bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Harnstoff wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit Essigester aufgenommen und „wie üblich“ aufgearbeitet. Es wird ein gelbes Öl erhalten. 4,7 g, R<sub>f</sub> 0,6 (S2); 0,3 (S3); 0,4 (S4); 0,85 (S5).

*Bildung des Aldehydes Alloc-β-Ala-H 3 (Methode C) [165]*

Alloc-β-Ala-Dimethylhydroxamat **2** (1 Äqu., 4,7 g) wird in 20 ml trockenem THF gelöst und mit Argon gespült. Die Mischung wird auf 0°C abgekühlt. Lithium-Aluminiumhydrid (1,2 Äqu., 1 g) wird vorsichtig portionsweise zugeben. Hierbei ist eine deutliche Gasentwicklung zu beobachten. Es wird weitere 15 Minuten gerührt und anschließend auf Raumtemperatur

erwärmt. Das Reaktions-Gemisch wird eine weitere Stunde gerührt und anschließend wird mit einer konzentrierten  $\text{KHSO}_4$ -Lösung hydrolysiert. Das THF wird im Vakuum entfernt. Die wässrige Lösung wird dreimal mit Ether extrahiert. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Filtrieren wird das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Das erhaltene Produkt ist ein Öl, das sofort weiterverwendet werden sollte. 3,1 g,  $R_f$  0,6 (S2); 0,3 (S3); 0,6 (S4); 0,72 (S5).

*Darstellung des N-funktionalisierten-Tyrosin-Blockes:  $\text{HN}[(\text{CH}_2)_3\text{-NH-Alloc}]\text{Tyr}(\text{Bu}^t)\text{-OBu}^t$  **4** (Methode D)*

Das geschützte Tyrosin-Derivat  $\text{Tyr}(\text{Bu}^t)\text{-OBu}^t \cdot \text{HCl}$  (1 Äqu., 4,7 g) wird in über Molsieb getrocknetem Methanol gelöst. Um wasserfrei zu arbeiten, wird Molsieb in den Reaktionskolben gegeben. Es werden (1 Äqu., 1,99 ml) Triethylamin sowie der frisch hergestellte Aldehyd Alloc- $\beta$ Ala-H (1,1 Äqu., 2,5 g) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt wurde, wird portionsweise Natriumcyano-borhydrid (1,1 Äqu., 1 g) innerhalb von 30 Minuten zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht gerührt. Das Molsieb wird abgetrennt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und dreimal mit  $\text{KHSO}_4$ -Lsg. und dreimal mit NaCl-Lsg. ausgeschüttelt. Die Essigesterphase wird schließlich über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und i.Vak. eingeeengt. 5 g Rohprodukt,  $t_R$  29,1 min (System I, Gradient 2),  $R_f$  0,4 (S2); 0,55 (S3), ESI-MS: M (ber.) 434,5; M (gef.) 435,7  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 457,2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 473,9  $[\text{M}+\text{K}]^+$ . Die Reinigung des Produktes erfolgte durch Flashchromatographie. Hierbei wurden mit einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester-Hexan (9:1) als mobiler Phase gute Trennungen erzielt.

*Darstellung des geschützten Pseudodipeptides  $\text{Fmoc-Abu}\psi[\text{CO-N}((\text{CH}_2)_3\text{-NH-Alloc})]\text{Tyr}(\text{Bu}^t)\text{-OBu}^t$  **5** (Methode E)*

Fmoc-Abu-OH (1,12 g, 3,45 mmol), TFFH (0,91 g, 3,45 mmol) und DIPEA (0,89 g, 6,90 mmol) werden in 10 ml DMF gelöst. Nach 13 min wird  $\text{HN}[(\text{CH}_2)_3\text{NHAlloc}]\text{Tyr}(\text{Bu}^t)\text{-OBu}^t$  **4** (1 g, 2,30 mmol) zugeben. Man lässt das Reaktionsgemisch 4 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Anschließend wird die Mischung mit 500 ml Essigester verdünnt und „wie üblich“ aufgearbeitet. 1,62 g Rohprodukt,  $t_R$  55,5 min (System I, Gradient 2),  $R_f$  0,65 (S3); 0,8 (S4). ESI-MS: M (ber.) 741,4; M (gef.) 742,9  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 764,2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Die Reinigung des Produktes erfolgte durch Flashchromatographie. Hierzu wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester: Hexan als mobiler Phase

gearbeitet. Durch ein Gemisch aus Essigester: Hexan 9:1 konnten akzeptable Trennungen erzielt werden.

*Darstellung des Pseudodipeptides Fmoc-Abu $\omega$ [CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH 6*

**(Methode F)**

Das geschützte Pseudodipeptid 5 wird für 2 Stunden mit 50-prozentigem TFA in DCM behandelt. Das Reaktionsgemisch wird i. Vak. zur Trockne eingeeengt. Die Reinigung des Produktes erfolgt erneut durch Flashchromatographie. 0,73 g,  $t_R$  32,7 min (System I, Gradient 2),  $R_f$  0,45 (S1); 0,95(S2); 0,40 (S3). ESI-MS: M (ber.) 629,4; M (gef.) 630,2  $[M+H]^+$ ; 652,3  $[M+Na]^+$ ; 669,1  $[M+K]^+$ . F. 110-113°C.

<sup>1</sup>H NMR:  $\delta$  7,77-6,64 (15H, 14 Aryl und 1 NH),  $\delta$  6,0-5,8 (CH, 1 H, Alkyl),  $\delta$  5,24-5,1 (CH<sub>2</sub>, 2H, Alkyl),  $\delta$  4,44-4,2 (CH<sub>2</sub>, Tyr, Fmoc),  $\delta$  3,1-2,7 (CH, Tyr, Abu),  $\delta$  3,39-1,11 (CH<sub>2</sub>, Abu, Alkyl-Kette),  $\delta$  0,89-0,85 (CH<sub>3</sub>, Abu).

<sup>13</sup>C NMR:  $\delta$  166,41-166,3 (CO. Allyl),  $\delta$  156-149 (2 CO, Fmoc, Abu),  $\delta$  130-120 (18 Aryl, Fmoc, Tyr),  $\delta$  117,32 (H<sub>2</sub>C= Allyl),  $\delta$  115,41 (=CH, Allyl),  $\delta$  67,38-66,23 (CH<sub>2</sub>, Fmoc),  $\delta$  64,35-56 (CH<sub>2</sub>-O, Allyl),  $\delta$  47,69 (CH, Fmoc),  $\delta$  40,06-38 (CH, Abu, Tyr),  $\delta$  33,8 (CH<sub>2</sub>, Abu, Tyr),  $\delta$  29,13-24 (CH<sub>2</sub>, Alkylkette),  $\delta$  31,76, 10,86 (CH<sub>3</sub>, Abu)

*Versuche zur Darstellung von 5 mit Fmoc-Abu-F und Zusatz von Collidin (Methode G)*

Zu einer Lösung von 4 (1 g, 2,3 mmol) in DCM werden sym. Collidin (0,57 ml, 4,38 mmol) und Fmoc-Abu-F 51 (1,5 g, 4,53 mmol) gegeben. Die klare Lösung wird 4 Stunden unter Rückfluss gekocht. Anschließend wird die Mischung mit 100 ml DCM verdünnt und dreimal mit KHSO<sub>4</sub>-Lsg. und dreimal mit NaCl-Lsg. ausgeschüttelt. Die Essigesterphase wird schließlich über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und i. Vak. eingeeengt. Ausbeute: 1,6 g. Das Rohprodukt erhält neben dem Pseudodipeptid noch beide Ausgangsprodukte und ein unbekanntes Produkt  $t_R$  40 min, M (gef.) 662,3. 500 mg des Rohproduktes werden zur Abspaltung der tert. Butyl- Schutzgruppen in 10 ml (93% TFA, 5 % H<sub>2</sub>O und 2% TIS) und 3 ml DCM gelöst und für 3 Stunden stengelassen. Die Reaktionslösung wird i. Vak. eingeeengt und der Rückstand mit Diethylether verrieben. Insgesamt wurden 480 mg Rohprodukt erhalten.  $t_R$  33,0 min (System I, Gradient 2) (6), ESI-MS: M (ber.) 629,95; M (gef.) 630,5  $[M+H]^+$ ; 652,7  $[M+Na]^+$ ; 669,1  $[M+K]^+$ . Das unbekannte Produkt reagiert nicht mit TFA.

*Versuche zur Darstellung von 6 über Fmoc-Abu  $\psi$ [CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH-Alloc)]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH 8  
HN[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH 7*

Nach Methode **D** werden H-Tyr (Bu<sup>t</sup>)-OH (3,32 g, 14 mmol), Methanol 60 ml, Molsieb (3 g), TEA (1,9 ml, 14 mmol), Aldehyd **3** (2,24 g, 15,4 mmol) und NaCNBH<sub>3</sub> (0,88 g, 14 mmol) umgesetzt.. Das Rohprodukt (gelbes Öl) enthält Dialkyltyrosin. Ausbeute nach Reinigung durch Flash-Chromatographie: 0,55 g (10% d.Th.). t<sub>R</sub> 16,5 min (System I, Gradient 2). R<sub>f</sub> 0,82 (S1); 0,3 (S2); 0,35 (S3); 0,7 (S4). ESI-MS: M (ber.) 379,1; M (gef.) 402,0 [M+Na]<sup>+</sup>; 418,1 [M+K]<sup>+</sup>.

*Fmoc-Abu $\psi$ [CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc)]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH 8*

Verbindung **7** (100 mg, 0,26 mmol) wird in 2 ml DCM suspendiert. Nach Zugabe des BTSA (172  $\mu$ l, 0,79 mmol) lässt man für 24 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Dabei muss eine klare Lösung entstehen. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 0°C gekühlt und mit DIPEA (90  $\mu$ l, 0,53 mmol) versetzt. Fmoc-Abu-F (173 mg, 0,53 mmol) wird portionsweise so zugegeben, dass immer wieder eine klare Lösung entsteht. Man lässt eine weitere Stunde bei 0°C und drei Stunden bei Raumtemperatur rühren. Im Anschluss wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 100 ml Essigester aufgenommen und „wie üblich“ aufgearbeitet. Es wird ein gelbes Öl erhalten (290 mg). t<sub>R</sub> 45,2 min (System I, Gradient 2) (**8**), Ausbeute 9%.

*Fmoc-Abu $\psi$ [CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH 6*

Das geschützte Pseudodipeptid **8** wird für 2 Stunden mit 50-prozentiger TFA in DCM behandelt. Das Reaktionsgemisch wird i. Vak. zur Trockne eingengt. Die Reinigung des Produktes erfolgt durch Flashchromatographie (Essigester/Hexan 9:1). t<sub>R</sub> 32,7 min (System I, Gradient 2).

**Synthese von Fmoc-Abu $\Psi$ [CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH 14**

*Alloc- $\gamma$ -Abu-OH 9*

H- $\gamma$ -Abu-OH (2,5 g, 24,21 mmol), Alloc-Cl (2,66 g, 22,06 mmol) und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5,26 g, 49,6 mmol). Die Umsetzung erfolgt nach Methode **A**. Die Ausbeute beträgt 4,16 g (90% d.Th.). R<sub>f</sub> 0,45 (S1); 0,51 (S2), 0,45 (S4)



*Alloc- $\gamma$ -Abu-N(CH<sub>3</sub>)-OCH<sub>3</sub> (Alloc- $\gamma$ -Abu-DMH) 10*

Alloc- $\gamma$ -Abu-OH **9** (4,1 g, 22 mmol), N,O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (2,35 g, 24 mmol) werden in 70 ml DCM gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend werden DIPEA (4,12 g, 24 mmol) und DCC (4,52 g, 22 mmol) zugegeben. Umsetzung und Aufarbeitung erfolgen nach Methode **B**. Die Ausbeute beträgt 4,84 g. R<sub>f</sub> 0,65 (S2); 0,55 (S4).

*Bildung des Aldehydes Alloc- $\gamma$ -Abu-H 11*

Der Aldehyd wird aus Alloc- $\gamma$ -Abu-DMH **10** (4,5 g, 19,5 mmol), LiAlH<sub>4</sub> (0,93 g, 24,4 mmol) und KHSO<sub>4</sub> (4,6 g, 34,1 mmol) nach Methode **C** gebildet. Die Rohausbeute beträgt 91%. R<sub>f</sub> 0,65 (S2); 0,65 (S4).

*HN[(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> 12*

Alloc- $\gamma$ -Abu-H **11** (1,43 g, 8,33 mmol), H-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>•HCl (2,5 g, 7,57 mmol), TEA (0,76 g, 7,57 mmol) und NaCNBH<sub>3</sub> (0,525 g, 8,33 mmol) werden nach Methode **D** umgesetzt. Die Ausbeute beträgt 1,7 g. t<sub>R</sub> 29,1 min, R<sub>f</sub> 0,46 (S2); 0,53 (S3). ESI-MS: M (ber.) 448,2; M (gef.) 449,5 [M+H]<sup>+</sup>; 471,5 [M+Na]<sup>+</sup>.

*Fmoc-AbuΨ[CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Alloc)]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> 13*

Die Darstellung erfolgt mit Fmoc-Abu über die Aktivierung mit TFFH nach Methode **E**: HN[(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> **12** (1 g, 2,22 mmol), Fmoc-Abu-OH (1,1 g, 3,3 mmol), TFFH (0,88 g, 3,34 mmol) und DIPEA (0,86 g, 6,65 mmol). Die Ausbeute beträgt 1,4 g, t<sub>R</sub> 56,4 min (System I, Gradient 2), R<sub>f</sub> 0,65(S3); 0,80 (S4). ESI-MS: M (ber.) 755,4; M (gef.) 756,4 [M+H]<sup>+</sup>; 778,3 [M+Na]<sup>+</sup>; 794,2 [M+K]<sup>+</sup>.

*Fmoc-AbuΨ[CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH 14*

Die Abspaltung der Schutzgruppen und die Reinigung erfolgen nach Methode **F**.

t<sub>R</sub> 34,3 min (System I, Gradient 2), R<sub>f</sub> 0,45 (S1); 0,45 (S3). ESI-MS: M (ber.) 643,4; M (gef.) 644,1 [M+H]<sup>+</sup>; 666,2 [M+Na]<sup>+</sup>; 682,1 [M+K]<sup>+</sup>. F. 107-110°C.

<sup>1</sup>H NMR: δ 7,88-6,64 (15 H, <sup>14</sup>aryl und <sup>1</sup>NH), δ 6,0-5,8 (CH, 1H, Alkyl), δ 5,24-5,1 (CH<sub>2</sub>, 2H, Alkyl), δ 4,44-4,2 (CH<sub>2</sub>, Tyr, Fmoc), δ 3,1-2,7 (CH, Tyr, Abu), δ 3,49-1,11 (CH<sub>2</sub>, Abu, Alkyl-Kette), δ 0,89-0,85(CH<sub>3</sub>, Abu).

<sup>13</sup>C NMR: δ 130-120 (18 Aryl, Fmoc, Tyr), δ 117,25 (H<sub>2</sub>C=, Allyl), δ 115,41 (=CH, Allyl), δ 66,23 (CH<sub>2</sub>, Fmoc), δ 64,49 (CH<sub>2</sub>-O, Allyl), δ 47,69 (CH, Fmoc), δ 40,06-40 (CH, Abu, Tyr), δ 33,8 (CH<sub>2</sub>, Abu, Tyr), δ 29,13-24 (CH<sub>2</sub>, Alkylkette), δ 31,76, 10,86 (CH<sub>3</sub>, Abu).

**Synthese von Fmoc-AbuΨ[CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH 20***Synthese von Alloc-Ava-OH 15*

H-Ava-OH (2,5 g, 21,33 mmol), Alloc-Cl (2,33 g, 19,32 mmol) und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,63 g, 43,63 mmol) werden nach Methode **A** umgesetzt. R<sub>f</sub> 0,5 (S1); 0,55 (S2).

*Alloc-Ava-N(CH<sub>3</sub>)-OCH<sub>3</sub> (Alloc-Ava-DMH) 16*

Alloc-Ava-OH **15** (4,1 g, 20,37 mmol), N,O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (2,19 g, 22,4 mmol) werden in 70 ml DCM gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wird mit DIPEA (3,9 ml, 22,4 mmol) und DCC (4,20 g, 20,4 mmol) nach Methode **B** umgesetzt. R<sub>f</sub> 0,71 (S2); 0,52 (S4).

*Bildung des Aldehydes Alloc-Ava-H 17*

Alloc-Ava-DMH **16** (4 g, 16,36 mmol), LiAlH<sub>4</sub> (0,77 g, 20,77 mmol) und KHSO<sub>4</sub> (3,9 g, 2,86 mmol) werden nach Methode **C** umgesetzt. R<sub>f</sub> 0,71 (S2); 0,72 (S4).

*HN[(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> 18*

Alloc-Ava-H **17** (1,54 g, 8,3 mmol), H-Tyr(Bu<sup>t</sup>)OBu<sup>t</sup>\*HCl (2,5 g, 7,57 mmol), TEA (0,765 g, 7,57 mmol) und NaCNBH<sub>3</sub> (0,522 g, 8,3 mmol) lässt man nach Methode **D** reagieren. t<sub>R</sub> 31,9 min (System I, Gradient 2), R<sub>f</sub> 0,54 (S2); 0,51 (S3), 0,55 (S4), ESI-MS: M (ber.) 462,5; M (gef.) 463,8 [M+H]<sup>+</sup>; 485,9 [M+Na]<sup>+</sup>.

*Fmoc-AbuΨ[CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-Alloc)]Tyr(But)-OBu<sup>t</sup> 19*

Derivat **18** (1 g, 2,16 mmol), Fmoc-Abu-OH (1,05 g, 3,24 mmol), TFFH (0,856 g, 3,24 mmol) und DIPEA (0,84 g, 6,49 mmol) werden nach Methode **E** miteinander umgesetzt. t<sub>R</sub> 57,7 min (System I, Gradient 2), R<sub>f</sub> 0,72 (S3); 0,81 (S4). ESI-MS: M (ber.) 769,4; M (gef.) 770,5 [M+H]<sup>+</sup>; 792,8 [M+Na]<sup>+</sup>; 808,2 [M+K]<sup>+</sup>.

*Fmoc-AbuΨ[CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH 20*

Die Schutzgruppenabspaltung erfolgt nach Methode **F**. t<sub>R</sub> 35,5min (System I, Gradient 2), R<sub>f</sub> 0,55 (S1); 0,45 (S3). ESI-MS: M (ber.) 657,4; M (gef.) 658,1 [M+H]<sup>+</sup>; 680,3 [M+Na]<sup>+</sup>; 696,2 [M+K]<sup>+</sup>. F. 101-104°C.

<sup>1</sup>H NMR: δ 7,9-6,5 (15H, 14 Aryl und 1 NH), δ 5,8 (CH, 1H, Alkyl), δ 5,2-5,1 (CH<sub>2</sub>, 2H, Alkyl), δ 4,4-4,2 (CH<sub>2</sub>, Tyr, Fmoc), δ 2,8-2,4 (CH, Tyr, Abu), δ 3,46-1,08 (CH<sub>2</sub>, Abu, Alkyl-Kette), δ 0,94-0,82 (CH<sub>3</sub>, Abu).

$^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  171-156 (3 CO, Fmoc, Abu, Tyr),  $\delta$  130-119 (18 Aryl, Fmoc, Tyr),  $\delta$  117,32 ( $\text{H}_2\text{C}=\text{, Allyl}$ ),  $\delta$  115,54 ( $=\text{CH, Allyl}$ ),  $\delta$  72-66,23 ( $\text{CH}_2$ , Fmoc),  $\delta$  64,35-49 ( $\text{CH}_2\text{-O, Allyl}$ ),  $\delta$  47,69 ( $\text{CH, Fmoc}$ ),  $\delta$  40,81-36,19 ( $\text{CH, Abu, Tyr}$ ),  $\delta$  32,8-28 ( $\text{CH}_2$ , Abu, Tyr),  $\delta$  28,2-23-24 ( $\text{CH}_2$ , Alkylkette).

### Synthese von Fmoc-Abu $\Psi$ [CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH **26**

#### *Alloc- $\epsilon$ -Ahc-OH* **21**

H- $\epsilon$ -Ahc-OH (5 g, 38,1 mmol), Alloc-Cl (4,17 g, 34,6 mmol) und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (8,27 g, 78 mmol) wurden nach Methode **A** umgesetzt. R<sub>f</sub> 0,55 (S1); 0,55 (S2).

#### *Alloc- $\epsilon$ -Ahx-N(CH<sub>3</sub>)-OCH<sub>3</sub> (Alloc- $\epsilon$ -Ahx-DMH)* **22**

Alloc- $\epsilon$ -Ahx-OH **21** (7,8 g, 36,24 mmol), N,O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (3,98 g, 40,8 mmol) werden in 70 ml DCM gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend werden DIPEA (6,8 ml, 40,8 mmol) und DCC (7,48 g, 36,24 mmol) entsprechend Methode **B** zugegeben. R<sub>f</sub> 0,9 (S1); 0,75 (S2).

#### *Bildung des Aldehydes Alloc- $\epsilon$ -Ahx-H (Methode C)* **23**

Alloc- $\epsilon$ -Ahx-DMH **22** (1 g, 3,87 mmol), LiAlH<sub>4</sub> (0,184g, 4,84 mmol) und KHSO<sub>4</sub> (0,92g, 6,77 mmol). R<sub>f</sub> 0,75 (S2); 0,75 (S4).

#### *HN[(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>* **24**

Alloc- $\epsilon$ -Ahx-H **23** (0,66 g, 3,33 mmol), H-Tyr(Bu<sup>t</sup>)OBut•HCl (1 g, 3,03 mmol), TEA (0,31 g, 3,03 mmol) und NaCNBH<sub>3</sub> (0,21 g, 3,33 mmol) werden nach Methode **D** umgesetzt. t<sub>R</sub> 33,4 min (System I, Gradient 2), R<sub>f</sub> 0,57 (S2); 0,74 (S3). ESI-MS: M (ber.) 476,5; M (gef.) 477,2 [M+H]<sup>+</sup>; 499,3 [M+Na]<sup>+</sup>; 515,4 [M+K]<sup>+</sup>.

#### *Fmoc-Abu $\Psi$ [CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-Alloc)]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>* **25**

Tyrosinderivat **24** (0,7 g, 1,47 mmol), Fmoc-Abu-OH (0,597 g, 2,21 mmol), TFFH (0,485 g, 2,2 mmol) und DIPEA (0,47 g, 4,41 mmol) werden nach Methode **E** umgesetzt. t<sub>R</sub> 59,1 min (System I, Gradient 2), R<sub>f</sub> 0,75 (S3); 0,85 (S4). ESI-MS: M (ber.) 783,3; M (gef.) 784,9 [M+H]<sup>+</sup>; 806,7 [M+Na]<sup>+</sup>; 822,6 [M+K]<sup>+</sup>.

***Fmoc-AbuΨ[CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH 26***

Die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen von Verbindung **25** erfolgt nach Methode F.  $t_R$  35,7 min (System I, Gradient 2),  $R_f$  0,55 (S1); 0,5 (S3). ESI-MS: M (ber.) 671,3; M (gef.) 672,1 [M+H]<sup>+</sup>; 694,3 [M+Na]<sup>+</sup>; 710,2 [M+K]<sup>+</sup>. F. 125-127°C.

<sup>1</sup>H NMR: δ 7,93-6,64 (15H, 14 Aryl und 1 NH), δ 5,86 (CH, 1H, Alkyl), δ 5,24-5,1 (CH<sub>2</sub>, 2H, Alkyl), δ 4,64-4,2 (CH<sub>2</sub>, Tyr, Fmoc), δ 3,1-2,4 (CH, Tyr, Abu), δ 3,44-1,08 (CH<sub>2</sub>, Abu, Alkyl-Kette), δ 0,87-0,82 (CH<sub>3</sub>, Abu).

<sup>13</sup>C NMR: δ 162,41-157,3 (3CO, Allyl, Fmoc, Abu), δ 134,31-120 (18 Aryl, Fmoc, Tyr), δ 117,16 (H<sub>2</sub>C=, Allyl), δ 115,24 (=CH, Allyl), δ 67,35 (CH<sub>2</sub>, Fmoc), δ 64,47 (CH<sub>2</sub>-O, Allyl), δ 59,69 (CH, Fmoc), δ 40,06-38 (CH, Abu, Tyr), δ 31,9-31,19 (CH<sub>2</sub>, Abu, Tyr), δ 29,13-24 (CH<sub>2</sub>, Alkylkette), δ 31,76, 10,86 (CH<sub>3</sub>, Abu).

**Synthese von Fmoc-AbuΨ[CO-N(CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH 32*****Alloc-NH-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-COOH 27***

H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-COOH (5 g, 21,8 mmol), Alloc-Cl (3,45 g, 28,62 mmol) und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6,74 g, 63,58 mmol) wurden nach Methode A umgesetzt. Es wird ein gelbes Öl erhalten.  $R_f$  0,65 (S2); 0,35 (S3); 0,4 (S4).

***Alloc-HN-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-CO-N(CH<sub>3</sub>)-OCH<sub>3</sub> (Alloc-NH-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-CO-DMH) 28***

Alloc-NH-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-COOH **27** (7 g, 29,01 mmol) und N,O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (3,11 g, 31,91 mmol) werden in 70 ml DCM gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend werden DIPEA (4,12 ml, 31,91 mmol) und DCC (5,98 g, 25,02 mmol) entsprechend Methode B zugegeben.  $R_f$  0,6 (S2); 0,3 (S3); 0,45 (S4).

***Bildung des Aldehydes Alloc-NH-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-CHO 29***

Der Aldehyd wird aus Alloc-NH-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-CO-DMH **28** (2,37 g, 8,32 mmol), LiAlH<sub>4</sub> (0,395 g, 10,40 mmol) und KHSO<sub>4</sub> (1,98 g, 14,56 mmol) nach Methode C gebildet.  $R_f$  0,6 (S2); 0,7 (S4).

***HN[CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> 30***

Alloc-NH-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-CHO **29** (1,13 g, 5,01 mmol), H-Tyr(Bu<sup>t</sup>)OBu<sup>t</sup>•HCl (1,5 g, 4,55 mmol), TEA (0,16 g, 4,55 mmol) und NaCNBH<sub>3</sub> (0,315 g, 5,01 mmol) werden nach Methode D umgesetzt.  $t_R$  34,3 min,  $R_f$  0,78 (S2); 0,86 (S3). ESI-MS: M (ber.) 501,5; M (gef.) 502,2 [M+H]<sup>+</sup>; 524,3 [M+Na]<sup>+</sup>.

***Fmoc-AbuΨ[CO-N(CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Alloc)]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> 31***

Tyrosinderivat **30** (1,35 g, 2,68 mmol) wird nach Methode **E** mit Fmoc-Abu-OH (1,31 g, 4,02 mmol), TFFH (1,065 g, 4,02 mmol) und DIPEA (1,05 g, 8,12 mmol) umgesetzt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Flash-Chromatographie. *t<sub>R</sub>* 59,4 min (System I, Gradient 2), *R<sub>f</sub>* 0,75 (S3); 0,90 (S4). ESI-MS: *M* (ber.) 808,3; *M* (gef.) 809,2 [M+H]<sup>+</sup>; 831,6 [M+Na]<sup>+</sup>; 847,4 [M+K]<sup>+</sup>.

***Fmoc-AbuΨ[CO-N(CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH 32***

Die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen von Verbindung **31** erfolgt nach Methode **F**. *t<sub>R</sub>* 37,7 min (System I, Gradient 2), *R<sub>f</sub>* 0,60 (S1); 0,55 (S3). ESI-MS: *M* (ber.) 696,5; *M* (gef.) 697,1 [M+H]<sup>+</sup>; 720,3 [M+Na]<sup>+</sup>; 736,2 [M+K]<sup>+</sup>. F. 117-121°C.

<sup>1</sup>H NMR: δ 7,88-6,64 (15H, 14 Aryl und 1 NH), δ 5,86 (CH, 1H, Alkyl), δ 5,27-5,1 (CH<sub>2</sub>, 2H, Alkyl), δ 4,4-4,1 (CH<sub>2</sub>, Tyr, Fmoc), δ 2,8-2,7 (CH, Tyr, Abu), δ 3,38-1,1 (CH<sub>2</sub>, Abu, CH-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>), δ 0,87-0,82 (CH<sub>3</sub>, Abu).

<sup>13</sup>C NMR: δ 134,37-120,49 (18 Aryl, Fmoc, Tyr), δ 117,25 (H<sub>2</sub>C=, Allyl), δ 115,41 (=CH, Allyl), δ 66,17 (CH<sub>2</sub>, Fmoc), δ 64,35 (CH<sub>2</sub>-O, Allyl), δ 60,70-25 (CH<sub>2</sub>, Alkylkette, Cyclohexan), δ 47,69 (CH, Fmoc), δ 40,06-38 (CH, Abu, Tyr), δ 33,8 (CH<sub>2</sub>, Abu, Tyr), δ 31,76, 10,86 (CH<sub>3</sub>, Abu).

**Synthese von Fmoc-AbuΨ[CO-NCH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-Alloc]Tyr(OH)-OH 38*****Alloc-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-COOH 33***

Nach Methode **A** werden H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-COOH (5 g, 24,2 mmol), Alloc-Cl (2,7 g, 22,4 mmol) und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,9 g, 74,5 mmol) umgesetzt. *R<sub>f</sub>* 0,65 (S2); 0,32 (S3); 0,45 (S4).

***Alloc-HN-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CO-N(CH<sub>3</sub>)-OCH<sub>3</sub> 34***

Alloc-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-COOH **33** (5,7 g, 22,8 mmol), N,O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (2,5 g, 25,6 mmol) werden in 50 ml DCM gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend werden DIPEA (3,26 g, 25,6 mmol) und DCC (4,7 g, 22,8 mmol) entsprechend Methode **B** zugegeben. *R<sub>f</sub>* 0,65 (S2); 0,35 (S3); 0,4 (S4).

***Bildung des Aldehydes Alloc-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CHO 35***

Dimethylhydroxamat **34** (3 g, 10,26 mmol), LiAlH<sub>4</sub> (0,49 g, 12,82 mmol) und KHSO<sub>4</sub> (2,45 g, 17,95 mmol) werden analog Methode **C** umgesetzt. *R<sub>f</sub>* 0,65 (S2); 0,75 (S4).

***HN[CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> 36 (Methode D)***

Aldehyd **35** (1,56 g, 6,06 mmol), H-Tyr(Bu<sup>t</sup>)OBu<sup>t</sup>•HCl (2 g, 6,67 mmol), TEA (0,85 ml, 6,06 mmol) und NaCNBH<sub>3</sub> (0,42 g, 6,67 mmol) werden nach Methode **D** umgesetzt. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie. *t<sub>R</sub>* 34,5 min (System I, Gradient 2), *R<sub>f</sub>* 0,52 (S2); 0,74 (S3); 0,74 (S4) ESI-MS :M (ber.) 510,2; M (gef.) 511,4 [M+H]<sup>+</sup>; 533,6 [M+Na]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR: δ 7,3-6,2 (10 H, 8 Aryl und 2 NH), δ 5,9-5,8 (CH, 1 H, Alkyl), δ 5,27-5,1 (CH<sub>2</sub>, 2H, Alkyl), δ 4,4-4,1 (CH<sub>2</sub>, Tyr, Fmoc), δ 3,1-2,4 (CH<sub>2</sub>, Alkylkette).

<sup>13</sup>C NMR: δ 173,2-153,3 (2 CO, Tyr, Allyl), δ 130,37-120,49 (12 Aryl, Alkyl-Seitenkette, Tyr), δ 117,22 (H<sub>2</sub>C=, Allyl), δ 115,41 (=CH, Allyl), δ 67,17-64,35 (CH<sub>2</sub>-O, Allyl), δ 42,69-40,2 (CH, Tyr), δ 38-33,8 (CH<sub>2</sub>, Alkyl-Seitenkette, Tyr, C Bu<sup>t</sup>), δ 30-27 (CH<sub>3</sub>, Bu<sup>t</sup>).

***Fmoc-AbuΨ[CO-NCH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> 37***

Nach Methode E werden der Verbindung **36** (1 g, 1,96 mmol), Fmoc-Abu-OH (0,96 g, 2,94 mmol), TFFH (0,776 g, 2,94 mmol) und DIPEA (0,76 g, 5,88 mmol) umgesetzt. *t<sub>R</sub>* 59,4 min (System I, Gradient 2), *R<sub>f</sub>* 0, 69 (S3); 0,85 (S4). ESI-MS: M (ber.) 817,2; M (gef.) 818,3 [M+H]<sup>+</sup>; 839,8 [M+Na]<sup>+</sup>; 856,6 [M+K]<sup>+</sup>.

***Fmoc-AbuΨ[CO-N(CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH 38***

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt nach Methode F. Eine vollständige Abtrennung der Ausgangs- und Nebenprodukte durch Flashchromatographie ist nicht möglich.

***Fmoc-Asnψ[CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc)]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH 39*****Versuche zur Darstellung in Lösung*****a) durch Umsetzung mit Fmoc-Asn-OPfp***

HN[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH **7** (200 mg, 0,53 mmol) wird in 2 ml DMF gelöst. Die Reaktionslösung wird auf 0°C gekühlt und mit Fmoc-Asn-OPfp (550 mg, 1,1 mmol) und DIPEA (180 µl, 1,1 mmol) versetzt. Der pH-Wert wird auf 8 mit DIPEA eingestellt und während der Reaktion konstant gehalten. Das Reaktionsgemisch wird 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und jeweils dreimal mit 5% KHSO<sub>4</sub>- und NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt besteht hauptsächlich aus Fmoc-Asn-OPfp (*t<sub>R</sub>* 20 min) und einem Nebenprodukt (*t<sub>R</sub>* 27 min). (System I, Gradient 2)

*b) unter Verwendung einer Mikrowelle*

Die Umsetzung von **7** (100mg) mit Fmoc-Asn-OPfp wird wie oben beschrieben durchgeführt, man lässt jedoch das Reaktionsgemisch 2 Stunden bei 50°C und 80 Watt in Mikrowelle rühren. Das Produkt wird als gelbes Öl erhalten, das aus **39** ( $t_R$  42.6 min, Ausbeute 20% bezogen auf HPLC-Elutionsdiagramm) und einem Nebenprodukt ( $t_R$  27 min, System I, Gradient 2) besteht.

*c) unter Verwendung einer Mikrowelle und Zusatz von BTSA*

Verbindung **7** (100 mg, 0,26 mmol) wird in 2 ml DCM gelöst. Nach der Zugabe des BTSA (129  $\mu$ l, 0,53 mmol) lässt man für 24 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktionslösung wird auf 0°C gekühlt und mit Fmoc-Asn-OPfp (274 mg, 0,53 mmol) und DIPEA (90  $\mu$ l, 0,53 mmol) versetzt. Der pH-Wert wird auf 8 mit DIPEA eingestellt und während der Reaktion gehalten. Es wird wie oben beschrieben umgesetzt und aufgearbeitet. Das Produkt wird als gelbes Öl erhalten. Es enthält das Produkt **39** ( $t_R$  42,5 min, Ausbeute 15%, bezogen auf HPLC) und zwei Nebenprodukte ( $t_R$  27 min,  $t_R$  35,1 min, System I, Gradient 2)

*d) unter Verwendung einer Mikrowelle und Zusatz von BTSA und TEA*

Die Umsetzung und Aufarbeitung erfolgt wie oben beschrieben. Anstelle von DIPEA wird TEA (72  $\mu$ l, 0,53 mmol) zusammen mit Fmoc-Asn-OPfp (274 mg, 0,53 mmol) zugegeben. Es wird ein gelbes Öl erhalten. Es enthält das Produkt **39** ( $t_R$  42.6 min, System I, Gradient 2, Ausbeute 22%, bezogen auf HPLC).

**Synthese von Fmoc-Asn(Trt) $\psi$ [CH<sub>2</sub>-NH]Tyr(OH)-OH **43*****Fmoc-Asn(Trt)-N(CH<sub>3</sub>)-OCH<sub>3</sub> **40***

Fmoc-Asn(Trt)-OH (500 mg, 0,84 mmol), N,O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (89,9 g, 0,95 mmol) werden in 15 ml AcCN gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend werden DIPEA (119,1 mg, 0,92 mmol) und DCC (173 mg, 0,84 mmol) nach Methode **B** zugegeben und aufgearbeitet.  $R_f$  0,4 (S3); 0,6 (S4).  $t_R$  48,3 min (System I, Gradient 2). ESI-MS: M (ber.) 639,9; M (gef.) 640,3 [M+H]<sup>+</sup>; 662,1 [M+Na]<sup>+</sup>; 678,5 [M+K]<sup>+</sup>.

*Synthese des Aldehydes Fmoc-Asn(Trt)-H **41***

Fmoc-Asn(Trt)-DMH (520 mg, 0,81 mmol), LiAlH<sub>4</sub> (38,55 mg, 1,01 mmol) und KHSO<sub>4</sub> (193,66 mg, 9,47 mmol) werden nach Methode **C** zum Aldehyd umgesetzt.  $R_f$  0,75 (S4).

$t_R$  41,5 min (System I, Gradient 2). ESI-MS: MW (ber.) 580,8; MW (gef.) 603,1  $[M+Na]^+$ ; 619,2  $[M+K]^+$ .

#### *Fmoc-Asn(Trt) $\psi$ (CH<sub>2</sub>-NH)Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> 42*

Das geschützte Tyrosin-Derivat H-Tyr(Bu<sup>t</sup>)OBu<sup>t</sup>•HCl (100 mg, 0,33 mmol) wird in 5 ml über Molsieb getrocknetem Methanol gelöst. Außerdem wird Molsieb in den Reaktionskolben gegeben. Es werden TEA (42  $\mu$ l, 0,33 mmol) und der frisch hergestellte Aldehyd von Fmoc-Asn(Trt)-H **41** (194 mg, 0,33 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem auf 0°C gekühlt wurde, wird portionsweise NaCNBH<sub>3</sub> (21 mg, 0,33 mmol) innerhalb von 30 Minuten zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht gerührt. Das Molsieb wird abgetrennt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, dreimal mit KHSO<sub>4</sub>-Lsg. und dreimal mit NaCl-Lsg. ausgeschüttelt. Die Essigesterphase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und i. Vak. zur Trockne eingengt. Ausbeute: 221 mg (80% d. Th.),  $t_R$  48,4 min (System I, Gradient 2)

#### *Fmoc-Asn $\psi$ [CH<sub>2</sub>-NH]Tyr(OH)-OH 43*

Nach Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen wird das Fmoc-Asn $\psi$ [CH<sub>2</sub>-NH]Tyr(OH)-OH analytisch charakterisiert.  $t_R$  21,9 min (System I, Gradient 2), ESI-MS: M (ber.) 503,6; M (gef.) 504,24  $[M+H]^+$ ; 526,3  $[M+Na]^+$ ; 542,2  $[M+K]^+$ .

### 6.3.2 Synthese ausgewählter Pseudodipeptide an polymeren Trägern

#### 6.3.2.1 Synthese am SASRIN-Harz

##### *HN[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-O-SASRIN-Harz 44*

Die Ankondensation von Fmoc-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH (1,5 Äqu., 61,4 mg) an das SASRIN-Harz (100 mg, Beladung 0,89 mmol/g) erfolgt mit DIC (1,7 Äqu., 23,4  $\mu$ l) und DMAP (0,01 Äqu., 0,1 mg) in 100  $\mu$ l DMF/DCM (1:3) bei 4°C in 20 Stunden. Zum Verkappen wird das Harz mit Benzoylchlorid (10 Äqu., 84,3 mg), Pyridin (10 Äqu., 47,5 mg) 30 Minuten geschüttelt. Die Beladung wird auf 0,6 mmol/g reduziert. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe und gründlichem Waschen wird das Harz 1 Stunde mit Alloc- $\beta$ Ala-H **3** (2,5 Äqu., 23,6 mg) und NaCNBH<sub>3</sub> (2,5 Äqu., 37,7 mg) in 200  $\mu$ l DMF, die 1% CH<sub>3</sub>COOH enthalten, umgesetzt.



*Fmoc-Abu*Ψ[CO-HN((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc)]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH **8**

Die Ankondensation von Fmoc-Abu-OH (4 Äqu., 78,1 mg) an **44** (61,4 mg, 0,6 mmol/g) erfolgt mit TFFH (4 Äqu., 63,4 mg, 15 min Voraktivierung), DIPEA (8 Äqu., 82,2 µl) in 100 µl DMF in 2 Stunden. Die Abspaltung vom Harz erfolgt mit 1% TFA in DCM. Ausbeute: 19 mg (45% d.Th.). t<sub>R</sub> 45,23 min (System I, Gradient 2).

*Fmoc-Asn(Dmcp)*Ψ[CO-N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH **45**

Die Ankondensation von Fmoc-Asn(Dmcp)-OH (4 Äqu., 628,6 mg) an **44** (600 mg, 0,6 mmol/g) erfolgt mit HATU (4 Äqu., 547,5 mg), HOAt (4 Äqu., 196 mg) und DIPEA (8 Äqu., 493 µl) in 3 Stunden. Die Abspaltung vom Harz wird mit 1% TFA in DCM vorgenommen. Ausbeute: 184 mg (64% d.Th.). t<sub>R</sub> 47,9 min (System I, Gradient 2)

*Fmoc-Asn(Trt)*Ψ[CO-N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH **46**

Die Ankondensation von Fmoc-Asn(Trt)-OH (4 Äqu., 859,3 mg) an **44** (600 mg, 0,6 mmol/g) erfolgt mit PyBrop (4 Äqu., 671,3 g) und DIPEA (8 Äqu., 493 µl) in 3 Stunden. Die Abspaltung vom Harz wird mit 1% TFA in DCM vorgenommen. Ausbeute: 189,4 mg (55% d.Th.). t<sub>R</sub> 56,3 min (System I, Gradient 2).

*Fmoc-Asn*Ψ[CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH **47**

Die vom polymeren Träger abgespaltenen Rohprodukte **45** und **46** werden für 2 Stunden mit 50% TFA behandelt. Die Reaktionslösungen werden in 200 ml Essigester gelöst und dreimal mit KHSO<sub>4</sub>-Lsg. sowie mit NaCl-Lsg. extrahiert. Nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Ausbeute: 60%. t<sub>R</sub> 26,4 min (System I, Gradient 2), R<sub>f</sub> 0,35 (S1), 0,3 (S3), F.173-175°C, ESI-MS: M (ber.) 658,4; M (gef.) 659,5 [M+H]<sup>+</sup>; 681,2 [M+Na]<sup>+</sup>; 697,2 [M+K]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR: δ 7,9-6,6 (15H, 14 Aryl und 1 NH), δ 5,9-5,8 (CH, 1 H, Alkyl), δ 5,2-5,1 (CH<sub>2</sub>, 2 H, Alkyl), δ 4,4-4,1 (CH<sub>2</sub>, Tyr, Fmoc), δ 2,9-2,4 (CH<sub>2</sub>, Tyr, Asn), δ 3,5-1,1 (CH<sub>2</sub>, Tyr, Alkylkette).

<sup>13</sup>C NMR: δ 173,41-166,3 (CO, Tyr), δ 156-149 (3 CO, Fmoc, Asn, Alloc), δ 130-120 (18 Aryl, Fmoc, Tyr), δ 117,32 (H<sub>2</sub>C=, Allyl), δ 115,41 (=CH, Allyl), δ 67,38-66,23 (CH<sub>2</sub>, Fmoc), δ 64,35-56 (CH<sub>2</sub>-O, Allyl), δ 47,69 (CH, Fmoc), δ 40,06-38 (CH, Asn, Tyr), δ 33,8 (CH<sub>2</sub>, Asn, Tyr).

### 6.3.2.2 Synthese am 2-Cl-Tritylharz

#### *Fmoc-Asn* $\Psi$ [CO-N((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHAlloc)]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-O-2-Cl-Trityl-Harz **39**

2-Chlortrityl-Chlorid-Harz (100 mg, Beladung 1,04 mmol/g) wird mit Fmoc-N[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHAlloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH (0,6 Äqu., 37,5 mg) und DIPEA (2,2 Äqu., 39,2  $\mu$ l) umgesetzt. Es wird eine Beladung von 0,14 mmol/g erreicht. Zum Verkappen wird mit Methanol 30 Minuten geschüttelt. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe wird mit Fmoc-Asn-OPfp (4 Äqu., 29,1 mg) in Anwesenheit von DIEA (8 Äqu., 19,18  $\mu$ l) wiederholt umgesetzt. Die Abspaltung vom Harz erfolgt mit 1% TFA/DCM. Zur vollständigen Gewinnung des Produktes wird das Harz dreimal intensiv mit DCM und mit Methanol gewaschen. Ausbeute: 3 mg.  $t_R$  42,6 min (System I, Gradient 2).

### 6.3.3 Darstellung von Aminosäurederivaten zur Zyklisierung

#### *N*-Alloc-1,4-*p*-Phenylendiamin (APD) **48** (Methode F)

N-Boc-1,4-Phenylendiamin (2 g, 9,6 mmol) wird in Methanol gelöst und mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg. (3 g, 28 mmol) zum Erreichen eines basischen pH-Wertes versetzt. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt. Man lässt Alloc-Cl (3 ml, 28,8 mmol) innerhalb von 2 Stunden zutropfen. Die Reaktionslösung wird 30 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Wasser und Methanol werden i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und dreimal mit KHSO<sub>4</sub>-Lsg. und dreimal mit NaCl-Lsg. ausgeschüttelt. Die Essigesterphase wird schließlich über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und i. Vak. eingengt. Ausbeute: 90%.  $t_R$  39,1 min (System I, Gradient 2),  $R_f$  0,65 (S1).

Nach dem Entfernen der Boc-Schutzgruppe mit 50% TFA in DCM innerhalb 1 Stunde und dem Entfernen von TFA und DCM i. Vak. wird der Rückstand fünfmal mit Ether gründlich gewaschen.  $t_R$  8,8 min (System I, Gradient 2),  $R_f$  0,3 (S1).

#### *Fmoc-Asp*(APD)-OH **49** (Methode G)

Fmoc-Asp-OBu<sup>t</sup> (1 g, 2,4 mmol) wird in trockenem THF gelöst und auf -15°C abgekühlt. Es werden NMM (0,27 ml, 2,4 mmol) und 1 Äqu. Chlorameisensäureisobutylester (0,3 ml, 2,3 mmol) zutropft. Nach 10 Minuten erfolgt die Zugabe einer Lösung aus Verbindung **48** (0,94 g, 4,8 mmol) und 2 Äqu. NMM (0,53 ml, 4,8 mmol) in maximal 5ml THF. Das Gemisch lässt man über Nacht reagieren. Das THF wird i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in 200 ml Essigester aufgenommen und dreimal mit KHSO<sub>4</sub>-Lsg. und dreimal mit NaCl-Lsg. ausgeschüttelt. Die Essigesterphase wird schließlich über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und i. Vak. eingengt.  $t_R$  44,3 min (System I, Gradient 2),  $R_f$  0,6 (S1).

Die t-Butyl-Schutzgruppe wird mit 50% TFA in DCM innerhalb 1 Stunde abgespalten. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand fünfmal mit Äther gründlich gewaschen.  $t_R$  32,9 min (Gradient 2), ESI-MS: M (ber.) 529,6; M (gef.) 530,39  $[M+H]^+$ ; 529,2  $[M+Na]^+$ .

#### *Synthese von Fmoc-Glu(APD)-OH 50*

Die Darstellung erfolgt analog Verbindung **49** nach Methode **G** aus Fmoc-Glu-OBu<sup>t</sup> (1 g, 2,4 mmol), NMM (0,8 ml, 7 mmol), Chlorameisensäureisobutylester (0,3 ml, 2,4 mmol) und ADP (0,9 g, 4,7 mmol).  $t_R$  44,3 min (System I, Gradient 2),  $R_f$  0,6 (S1).

Abspaltung der t-Butyl-Schutzgruppe und Aufarbeitung erfolgen analog Verbindung **53**.  $t_R$  32,62 min (System I, Gradient 2). ESI-MS: M (ber.) 543,3; M (gef.) 544,5  $[M+H]^+$ ; 566,1  $[M+Na]^+$ .

### **6.3.4 Synthesen der Aminosäurederivate**

#### *Fmoc-Abu-F 51*

Fmoc-Abu-OH (2 g, 6,1 mmol) wird in 60 ml getrocknetem DCM gelöst. Nach Zugabe von DAST (1,18 g, 7,32 mmol) lässt man 10 min bei Raumtemperatur weiter rühren. Die Lösung wird auf Eis gegossen. Das DCM wird abgetrennt und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Danach wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in DCM gelöst, mit Hexan versetzt und zum Kristallisieren bei 4°C stehen gelassen. Der Niederschlag wird abgefrittet und bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Bestimmung des Fluoridgehaltes wird eine analytische Probe 15 Minuten lang mit 5% Pyridin in Methanol stehen gelassen und mittels HPLC auf den gebildeten Methylester untersucht. Rohprodukt: 1,9 g. (laut HPLC 93% Fmoc-Abu-F und 7% Fmoc-Abu-OH).  $t_R$  (Fmoc-Abu-OMe) 30,27 min (System I, Gradient 2).

#### *Fmoc-Abu-Cl 52*

0,5 g Fmoc-Abu-OH (1,5 mmol) werden in 1 ml DMF und 8 ml getrocknetem DCM gelöst, auf 0°C abgekühlt und unter Rühren mit SOCl<sub>2</sub> (1,83 g, 15 mmol) versetzt. Man lässt das Reaktionsgemisch 1 Stunde bei Raumtemperaturiterrühren. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand in DCM gelöst, danach mit Hexan versetzt und bei 4°C zum Kristallisieren stehen gelassen. Der Niederschlag wird abgefrittet und bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Bestimmung des Chloridgehaltes wird eine analytische Probe 15 Minuten mit

5% Pyridin in Methanol stehen gelassen und mittels HPLC auf den gebildeten Methylester untersucht. Ausbeute: 94%.  $t_R$  37,2 min [( System I, Gradient 2), Fmoc-Abu-OMe)].

*Fmoc-Abu-N(CH<sub>3</sub>)-OCH<sub>3</sub> (Fmoc-Abu-DMH) 53*

Fmoc-Abu (4 g, 12,29 mmol), N,O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (1,32 g, 13,5 mmol) werden in 50 ml AcCN gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend werden DIPEA (2,28 ml, 13,5 mmol) und DCC (2,5 g, 12,2 mmol) zugegeben und nach Methode **B** umgesetzt sowie aufgearbeitet. Rohausbeute: 95%.  $R_f$  0,4 (S3), 0,6 (S4).

*Synthese von Fmoc-Abu-H (Methode C) 54*

Fmoc-Abu-DMH (2 g, 5,42 mmol), LiAlH<sub>4</sub> (0,25 g, 6,58 mmol) und KHSO<sub>4</sub> (1,29 g, 9,47 mmol) werden nach Methode **C** zum Aldehyd umgesetzt. Ausbeute: 91%.  $R_f$  0,40 (S2), 0,75 (S4).

*Fmoc-[N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH 55*

HN[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH **7** (2 g, 5,28 mmol) wird in 30 ml DCM suspendiert. Nach der Zugabe von BTSA (4,29 g, 21,1 mmol) lässt man für 24 Stunden bei Raumtemperatur rühren, bis eine klare Lösung entsteht. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 0°C gekühlt und mit DIEA (0,85 g, 6,5 mmol) versetzt. Das Fmoc-Cl (2,32 g, 6,5 mmol) wird portionsweise so zugegeben, dass immer wieder eine klare Lösung entsteht. Man lässt eine weitere Stunde bei 0°C und drei Stunden bei Raumtemperatur rühren. Im Anschluss wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und jeweils dreimal mit 5%iger KHSO<sub>4</sub>- und gesättigter NaCl- Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel entfernt. Es werden 2,7g Rohprodukt als gelbes Öl erhalten. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie gereinigt. Die Elution erfolgt mit einem Lösungsmittelgemisch aus Essigester: Hexan in folgenden Mischungsverhältnissen: 200 ml (4:6), 300 ml (5:5), 300 ml (8:2), 1000 ml (9:1), 700 ml (10:0)]. Ausbeute: 85 % (gereinigtes Produkt).  $t_R$  44.1 min (System I, Gradient 2),  $R_f$  0,6 (S1). ESI-MS: M(ber.) 600,6; M(gef.) 623,4 [M+Na]<sup>+</sup>; 639,5 [M+K]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR:  $\delta$  7,7-6,2 (15 H, 14 Aryl und 1 NH),  $\delta$  5,8 (CH, 1 H, Alkyl),  $\delta$  5,2-5,1 (CH<sub>2</sub>, 2 H, Alkyl),  $\delta$  4,4-4,1 (CH<sub>2</sub>, Tyr, Fmoc),  $\delta$  3,6-1,2 (CH<sub>2</sub>, Alkylkette),  $\delta$  1,1 (CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu).

$^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  173,41-166,3 (CO, Tyr),  $\delta$  156,3-134,2 (2 CO, Fmoc, Alloc),  $\delta$  130-120 (18 Aryl, Fmoc, Tyr),  $\delta$  117,32 ( $\text{H}_2\text{C}=\text{}$ , Allyl),  $\delta$  114,41 ( $=\text{CH}$ , Allyl),  $\delta$  67,38-66,23 ( $\text{CH}_2$ , Fmoc),  $\delta$  64,35-56 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ , Allyl),  $\delta$  47,23 (CH, Fmoc),  $\delta$  40,06-38 (CH, Tyr),  $\delta$  30,8-28,2 ( $\text{CH}_2$ , Seitenkette, Tyr).

#### *Synthese von Fmoc-[N((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc)]Tyr(<sup>t</sup>Bu)-OBu<sup>t</sup> (Methode H) 56*

HN[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc]Tyr(<sup>t</sup>Bu)-OBu<sup>t</sup> (9 g, 20,7 mmol), BTSA (16,84 g, 82,8 mmol), DIPEA (3,35 g, 25,9 mmol), Fmoc-Cl (6,70 g, 25,9 mmol). Das Rohprodukt wird als gelbes Öl erhalten. Rohausbeute 98%.  $t_{\text{R}}$ : 46,1min (System I, Gradient 2).

#### *Fmoc-[N((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc)]Tyr(OH)-OH 57*

Das Rohprodukt wird mit 50 ml 95%iger TFA für 3 Stunden behandelt. Die Säure wird i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Produktes erfolgt mittels Flashchromatographie. Hierzu wird mit einem Lösungsmittelgemisch aus Chloroform-Methanol [200 ml (10:0), 500 ml (95:5), 1000 ml (9:1), 500 ml (0:10)] als mobiler Phase gearbeitet. Ausbeute: 98%,  $t_{\text{R}}$ : 30,7min (System I, Gradient 2).

### 6.3.5 Festphasenpeptidsynthese

#### 6.3.5.1 Darstellung der linearen Oktapeptide OP 1 bis OP 9

Die Peptide wurden manuell nach der Fmoc-Strategie an einem polymeren Träger hergestellt. 200 mg Rink-Amid-MBHA-Harz mit einer Beladung von 0,73 mmol/g wurden in Polypropylen-Spritzen mit eingebauten Fritten gegeben, mit Lösungsmittel gequollen (20 min in DMF) und umgesetzt. Als Seitenkettenschutzgruppen für Asp und Glu wurden tert-Butylester verwendet. Von der C-terminalen Aminosäure wurde nur 1 Äqu. (Fmoc-Leu-OPfp oder Fmoc-Leu-OH) für die erste Kopplung eingesetzt, um die Beladung zu reduzieren. Zur Vermeidung von Fehlsequenzen, wurde mit Z(2-Cl)OSu (5 Äqu.) und DIPEA (10 Äqu.) nach Kopplung der ersten Aminosäure gekappt. Die Verlängerung der linearen Peptidsequenzen erfolgte mit Fmoc-geschützten Pentafluorphenylestern oder mit an der Carboxylgruppe freien Aminosäuren: Fmoc-AS-OPfp (4 Äqu.) mit DIPEA (8 Äqu.) oder Fmoc-AS-OH (4 Äqu.), HBTU (4 Äqu.), HOBt (4 Äqu.) mit DIPEA (8 Äqu.). Die Kopplungszeit betrug jeweils 1 Stunde. Zur vollständigen Umsetzung wurde die Kopplung mindestens einmal wiederholt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 20 proz. Piperidin in DMF (1•5 min, 2•15 min). Die Kopplungsausbeute wurde über die Menge des gebildeten Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes bei 301 nm bestimmt. Nach jedem

Kopplungsschritt und jeder Fmoc-Abspaltung wurde das Peptid-Harz gründlich mit DMF, DCM und erneut DMF gewaschen. Nachdem die Oktapeptidsequenz am polymeren Träger aufgebaut worden war, wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch die Boc-Schutzgruppe ersetzt oder es wurde die N-terminale Aminosäure als Boc-geschütztes Derivat ankondensiert.

Zur Phosphorylierung wurden Di-tert-butyl-diethyl-phosphoramidite oder Di-tert-butyl-diisopropyl-phosphoramidite (20 Äqu.) in DMF mit 5-Benzyl-1H-thiotetrazol (Hyacinth BMT) (60 Äqu.) als Katalysator eingesetzt. Die Umsetzung erfolgte innerhalb einer Stunde. Nach intensivem Waschen des Harzes mit DCM wurden tert-Butylperoxid (<sup>t</sup>BuOOH) oder m-Cl-Perbenzoesäure (10 Äqu.) in DCM als Oxidationsmittel zugesetzt. Nach dem Trocknen des Harzes i. Vak. erfolgte die Abspaltung des Peptides vom Harz bei gleichzeitiger Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen durch ein Gemisch von TFA (95%), Wasser (2,5%) und TIS (2,5%) innerhalb von 5 Stunden. Anschließend wurde die Lösung über Glaswolle filtriert und das Harz wurde mehrfach mit 95%TFA/Wasser gewaschen. Die Abspalllösung wurde in Diethylether getropft, das ausgefällte Peptid abzentrifugiert, mehrmals mit Diethylether gewaschen, in 80 proz. tert-Butanol gelöst und lyophilisiert. Die Ausbeute der Peptide lag zwischen 20%-50%.

Tab. 4: Lineare Oktapeptid-Liganden

Peptide-Nr.	Sequenz
<b>OP 1</b>	H-Glu-Gly-Leu-Asn- <b>p</b> Tyr-Met-Val-Leu-NH <sub>2</sub>
<b>OP 2</b>	Btn-Ado-Glu-Gly-Leu-Asn- <b>p</b> Tyr-Met-Val-Leu-NH <sub>2</sub>
<b>OP 3</b>	H-Glu-Gly-Leu-Asn- <b>p</b> Tyr-Ser(βPh)-Val-Leu-NH <sub>2</sub>
<b>OP 4</b>	Btn-Ado- Glu-Gly-Leu-Asn- <b>p</b> Tyr-Ser(βPh)-Val-Leu-NH <sub>2</sub>
<b>OP 5</b>	H-Glu-Gly-Leu-Asn- <b>p</b> Tyr-Met-Val-Ser(βPh)-NH <sub>2</sub>
<b>OP 6</b>	Btn-Ado-Glu-Gly-Leu-Asn- <b>p</b> Tyr-Met-Val-Ser(βPh)-NH <sub>2</sub>
<b>OP 7</b>	H-Glu-Gly-Leu-Asn- <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>
<b>OP 8</b>	H-Glu-Gly-Leu-Abu- <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>
<b>OP 9</b>	H-Glu-Gly-Leu-Abu-Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>

### 6.3.5.2 Darstellung der zyklischen Oktapeptide OP 10 bis OP 17

Die Synthese der linearen Vorstufen erfolgte im Wesentlichen wie im Abschnitt 6.3.5.1 beschrieben. Als Seitenkettenschutzgruppen wurden neben den tert. Butylresten auch die Alloc- (N-alkyl-Tyr, Lys) und OAll- (Asp, Glu) Schutzgruppe verwendet. Für die Synthese der zyklischen Peptide wurden drei verschiedene Strategien erprobt:

#### Strategie I: OP 10 und OP 11

- Synthese der linearen Sequenz mit N-funktionalisiertem Tyrosin
- Zyklisierung an fester Phase
- Phosphorylierung an fester Phase
- Abspaltung vom Harz

#### Strategie II: OP 11

- Synthese der linearen Sequenz mit N-funktionalisiertem Tyrosin
- Phosphorylierung an fester Phase
- Zyklisierung an fester Phase
- Abspaltung vom Harz

#### Strategie III: OP 10 bis OP 16

- Synthese des linearen Tripeptides
- Ankondensation der Pseudodipeptide an das Tripeptid-Harz
- Verlängern der linearen Sequenz
- Zyklisierung an der festen Phase
- Phosphorylierung an fester Phase
- Abspaltung vom Harz

Die Herstellung von Fmoc-Asp(Gly-OAll)-OH **56** und der Pseudodipeptide (**6**, **14**, **20**, **26**, **32**, **47**) ist in den Abschnitten 6.3.1 bis 6.3.4 beschrieben. Der Dipeptidblocks [Fmoc-Asp(Gly-OAll)-OH] und die Pseudodipeptide wurden 12 min mit TFFH (3 Äqu.) voraktiviert und an das polymergebundene Peptid gekoppelt. Die N-terminale Aminosäure wurde als Fmoc-Nle-OH durch Aktivierung mit PyBop (4 Äqu.), HOBt (4 Äqu.) und DIPEA (8 Äqu.) ankondensiert. Zur Darstellung unacylierter freier Oktapeptide wurde Boc-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OH nach Aktivierung mit PyBop (4Äqu.), HOBt (4Äqu.) und DIPEA (8Äqu.) ankondensiert. Die Synthese der Peptide **OP 10** und **OP 16** erfolgte nach Strategie **III**. Die Alloc- und OAll-Abspaltung erfolgte durch eine Mischung aus DMF, THF, 0,5N HCl, Morpholin (1:1:10,5:0,45) und einer Spatelspitze Pd<sup>0</sup>(PPh<sub>3</sub>) als Katalysator. Das Reaktionsgemisch

wurde 16 Stunden unter Argon geschüttelt, danach wurde das polymergebundene Peptid abfiltriert und gründlich mit DMF/THF(1:1) sowie DCM gewaschen. Die Zyklisierung durch Knüpfung der Laktambrücke zwischen der Asp-Seitenkette und dem N-funktionalisierten Tyrosin erfolgte mit 5 Äqu. PyBop und 10 Äqu. DIPEA. Die Kopplungsdauer betrug 3 Stunden.

Phosphorylierung, Entfernung der Schutzgruppen, Abspaltung vom Harz und die weitere Aufarbeitung der Peptide wurden mit zwei Ausnahmen wie bei den linearen Peptiden durchgeführt. Erstens betrug die Einwirkungszeit des TFA-Gemisches 6 Stunden und zweitens wurde die Abspaltung vor der Ether-Fällung i.Vak. auf 1 ml eingengt. Die Ausbeuten an Rohprodukten lagen zwischen 10%-60%.

Tab. 5: Synthetisierte Oktapeptide mit Rückgrat- und Seitenkettenzyklisierung

Peptid-Nr.	Sequenz
<b>OP 10</b>	$\begin{array}{c} \text{H-Glu-Gly-Leu-Asn}\Psi[\text{CO-N}] \text{pTyr-Nle-Asp-Leu-NH}_2 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ (\text{CH}_2)_3\text{-NH} \leftarrow \text{Gly} \end{array}$
<b>OP 11</b>	$\begin{array}{c} \text{H-Glu-Gly-Leu-Abu}\Psi[\text{CO-N}] \text{pTyr-Nle-Asp-Leu-NH}_2 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ (\text{CH}_2)_3\text{-NH} \leftarrow \text{Gly} \end{array}$
<b>OP 12</b>	$\begin{array}{c} \text{H-Glu-Gly-Leu-Abu}\Psi[\text{CO-N}] \text{ Tyr-Nle-Asp-Leu-NH}_2 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ (\text{CH}_2)_3\text{-NH} \leftarrow \text{Gly} \end{array}$
<b>OP 13</b>	$\begin{array}{c} \text{H-Glu-Gly-Leu-Abu}\Psi[\text{CO-N}] \text{pTyr-Nle-Asp-Leu-NH}_2 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ (\text{CH}_2)_4\text{-NH} \leftarrow \text{Gly} \end{array}$
<b>OP 14</b>	$\begin{array}{c} \text{H-Glu-Gly-Leu-Abu}\Psi[\text{CO-N}] \text{pTyr-Nle-Asp-Leu-NH}_2 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ (\text{CH}_2)_5\text{-NH} \leftarrow \text{Gly} \end{array}$
<b>OP 15</b>	$\begin{array}{c} \text{H-Glu-Gly-Leu-Abu}\Psi[\text{CO-N}] \text{pTyr-Nle-Asp-Leu-NH}_2 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ (\text{CH}_2)_6\text{-NH} \leftarrow \text{Gly} \end{array}$
<b>OP 16</b>	$\begin{array}{c} \text{H-Glu-Gly-Leu-Abu}\Psi[\text{CO-N}] \text{pTyr-Nle-Asp-Leu-NH}_2 \\   \qquad \qquad \qquad \downarrow \text{Gly} \\ \text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_{10}\text{-CH}_2\text{-NH} \end{array}$
<b>OP 17</b>	$\begin{array}{c} \text{H-Glu-Gly-Glu-Abu}\Psi[\text{CH}_2\text{-NH}] \text{pTyr-Nle-Lys-Leu-NH}_2 \\ \qquad \qquad \qquad \downarrow \qquad \qquad \qquad \downarrow \end{array}$



Der Aufbau des zyklischen Oktapeptides **OP 17** mit der reduzierten Peptidbindung erfolgte nach Strategie **I**. Dabei wurde die reduzierte Peptidbindung durch Ankondensation von Fmoc-Abu-H (3 Äqu.) und anschließender Reduktion mit  $\text{NaCNBH}_3$  in 1% Essigsäure/DMF in 3 Stunden am Harz dargestellt.

Tabelle 6 enthält die ausführlichen Protokolle der einzelnen Syntheseschritte zum Aufbau der zyklischen Oktapeptide **OP 10** bis **OP 16**

Tab. 6: Auflistung der Syntheseschritte für die Oktapeptide mit Rückgratzyklisierung

Syntheseschritt	Anzahl der Durchführungen	Zeit (min)	Reagenz
Quellen	1	20	DMF
Fmoc-Abspaltung	1	5	20 % Piperidin/ DMF
	1	15	
Waschen	4	1	DMF
	3	1	DCM
	3	1	DMF
<b>C-terminale (8.) Aminosäure</b>			
Kopplung	1	60	4 Äqu. Fmoc-Leu-OPfp
			8 Äqu. DIPEA DMF
Waschen	5	1	DMF
Kappen	1	20	5 Äqu. Z(2-Cl)OSu
			10 Äqu. DIPEA 1:1 DMF: DCM
Waschen	4	1	DMF
	3	1	DCM
	3	1	DMF
Fmoc-Abspaltung	1	5	20 % Piperidin/ DMF
	1	15	
Waschen	4	1	DMF
	3	1	DCM
	3	1	DMF

<b>7. Aminosäure</b>			
Kopplung	2	60	3 Äqu. Fmoc-Asp(GlyOAll)-OH 3 Äqu. TFFH 6 Äqu. DIPEA DMF Voraktivierung 12 min.
Waschen	5	1	DMF
Fmoc-Abspaltung	1	5	20 % Piperidin/ DMF
	1	10	
Waschen	4	1	DMF
	3	1	DCM
	3	1	DMF
<b>6.Aminosäure</b>			
Kopplung	2	60	4 Äqu.Fmoc-Nle-OH 4 Äqu. PyBOP 4 Äqu. HOBt 8 Äqu. DIPEA DMF
Waschen	5	1	DMF
Fmoc-Abspaltung	1	5	20 % Piperidin/ DMF
	1	10	
Waschen	4	1	DMF
	3	1	DCM
	3	1	DMF
<b>Pseudo-Dipeptid-Blöcke</b>			
Kopplung	2	180	3 Äqu. Pseudodipeptid 3 Äqu. PyBop 3 Äqu. HOBt 6 Äqu. DIPEA DMF
Waschen	5	1	DMF

Fmoc-Abspaltung	1	5	20 % Piperidin/ DMF
	1	10	
Waschen	4	1	DMF
	3	1	DCM
	3	1	DMF
<b>3.Aminosäure</b>			
Kopplung	2	60	4 Äqu. Fmoc-Leu-OPfp
			8 Äqu. DIPEA
Waschen	5	1	DMF
			DMF
			DMF
Fmoc-Abspaltung	1	5	20 % Piperidin/ DMF
	1	10	
Waschen	4	1	DMF
	3	1	DCM
	3	1	DMF
<b>2. Aminosäure</b>			
Kopplung	2	60	4 Äqu. Fmoc-Gly-OPfp
			8 Äqu. DIPEA
Waschen	5	1	DMF
			DMF
			DMF
Fmoc-Abspaltung	1	5	20 % Piperidin/ DMF
	1	10	
Waschen	4	1	DMF
	3	1	DCM
	3	1	DMF
<b>N-terminale Aminosäure</b>			
Kopplung	2	60	4 Äqu. Boc-Glu(OBu <sup>t</sup> )-OH
			4 Äqu PyBop
			4 Äqu. HOBt
			8 Äqu. DIPEA
			DMF

Waschen	5	1	DMF
Deacylierung des Tyrosins	1	5	20 % Piperidin/ DMF
	1	10	
Waschen	5	1	DMF
	3	1	DCM
Alloc/Alyll-Abspaltung	1	16	DMF: THF: HCL: Morpholine ( 1:1:0.5: 0,45) Spatelspitze Pd <sup>o</sup> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> unter Argon und Lichtschutz
Waschen	20		30 ml DMF: THF 1:1 30 ml DCM
Trocknen	20		
Zyklisierung			
Quellen	1	15	DMF
Zyklisierung	2	180	5 Äqu. PyBop 10 Äqu. DIPEA DMF
Waschen	5	1	DMF
	3	1	
Trocknen			DCM
Phosphorylierung			
Quellen	1	15	DMF
Phosphorylierung	1	180	60 Äqu. Hyacinth BMT 20 Äqu. Di-tert-Butyl N,Ndiethyl-phosphoramidite in DMF
Waschen	5	1	DMF
	3	1	DCM
Oxidation	1	60	10 Äqu. m-Cl-Perbenzoesäure DCM
Waschen	8	1	DCM
Trocknen			

Abspaltung	1	360	95 % TFA 2.5 % Wasser 2.5 % TIS
------------	---	-----	---------------------------------------

### 6.3.6 Enzymatischer Abbau

#### 6.3.6.1 Bestimmung der Stabilität der linearen und zyklischen Oktapeptide gegenüber Proteasen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, abbaustabile Phosphopeptid-Liganden für einen möglichen Einsatz in *in vivo* Untersuchungen und in Tierexperimenten zu entwickeln. Deshalb wurde der Abbau ausgewählter Oktapeptide durch isolierte Proteasen und durch ein Zellhomogenat untersucht. Um den Einfluss der Zyklisierung und besonders der Rückgratzyklisierung auf die Stabilität der Peptide gegenüber dem Abbau durch Proteasen und Phosphatasen bestimmen zu können, wurden folgende phosphorylierte Oktapeptide untersucht: **OP 8**, **OP 11** und **OP 17**. Das lineare Peptid **OP 8** diente als Vergleichspeptid. Mit dem zyklischen Oktapeptid **OP 11** wurde der Einfluss der Seitenketten-Zyklisierung und mit dem Oktapeptid **OP 17** der Einfluss der Seitenketten-Rückgratzyklisierung untersucht. Als isolierte Proteasen wurden Chymotrypsin und Proteinase K angewandt. Die Untersuchung der proteolytischen Spaltung erfolgte mittels analytischer HPLC in den Systemen II und III unter den angegebenen Bedingungen. Die Spaltung wurde zeitabhängig nach 20, 60 und 120 Minuten untersucht. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 6 N HCl abgestoppt. Zur HPLC-Analyse wurden die abgestoppten Proben einer Gefriertrocknung unterworfen und anschließend in 60 µl Wasser gelöst. Davon wurden 50 µl injiziert.

##### *Chymotrypsin*

Die Peptide **OP 8**, **OP 11** und **OP 17** (je 100 µg) werden getrennt in jeweils 100 µl Puffer (PBS, pH 7-7,5) gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 µl Chymotrypsin (58,3 Units pro mg) und 95 µl Puffer (PBS) bei 0°C gestartet. Der Abbau erfolgt bei Raumtemperatur. Gestoppt wird die Reaktion nach 2 min, 20 min, 60 min und 120 min. Dazu werden aliquote Volumina (50µl) entnommen und mit 25 µl HCl (1:1) versetzt. Nach der Gefriertrocknung wird die Probe in 60 µl Wasser gelöst, zentrifugiert und mittels HPLC analysiert.

##### *Proteinase K*

150 µg der Peptid **OP 8**, **OP 11** und **OP 17** werden in jeweils 150 µl Puffer (PBS, pH 7-7,5) gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 8 µl Proteinase K (8 DMC-U/ml) und 142 µl

Puffer bei 0°C gestartet. Der Abbau erfolgt bei Raumtemperatur und wird nach 2 min, 20 min, 60 min und 120 min gemessen. Stoppen, Aufarbeiten und HPLC-Analyse erfolgen wie bei Chymotrypsin.

#### *Homogenat von NIH 3T3-Zellen*

NIH 3T3-Zellen werden unter optimierten Bedingungen (HEPES-Puffer, 37°C, CO<sub>2</sub>-Begasung) mit komplettem Wachstumsmedium kultiviert. Nach dem Absaugen des HEPES-Puffers und mehrmaligem Waschen mit Phosphat-Puffer (PBS) werden  $0.3 \times 10^6$  Zellen in 500 µl PBS mit Ultraschall lysiert und anschließend bei 14000 x g 15 min zentrifugiert. Die Peptide **OP 8**, **OP 11**, **OP 17** (je 100 µg) werden in jeweils 100 µl Puffer (PBS, pH 7-7,5) gelöst. Die Reaktion wird mit 100 µl Homogenat bei 0°C gestartet. Abbau und Messung erfolgen analog zu Chymotrypsin.

#### **6.3.6.2 Stabilität des Phosphotyrosin-Restes gegenüber Phosphatase-Aktivität**

##### *Phosphatase-Aktivität der NIH 3T3-Zellen*

Um die Lebensdauer des Phosphotyrosin-Restes der Oktapeptide in den NIH 3T3-Zellen abschätzen zu können, erfolgte die Untersuchung des Abbaues ausgewählter Oktapeptide durch ein Zellhomogenat mit und ohne Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Da in Gegenwart von Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (50 µl frisch hergestellte und zentrifugierte Lösung) die Phosphatase-Aktivität vollständig gehemmt ist, erfolgt der Abbau nur noch durch Proteasen. In den HPLC-Elutionsdiagrammen kann bei einigen Oktapeptiden zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem Peptid unterschieden werden, wodurch bei diesen Peptiden eine exakte Auswertung möglich ist.

#### **6.3.7 Bestimmung des Einflusses der Oktapeptide auf die Aktivität der SHP-1**

Die Aktivität wurde mit dem Phosphatase-Test der Jena Bioscience GmbH auf einer 96-Well-Platte durchgeführt. Als Substrat wurde p-Nitrophenylphosphat in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. Pro Well (50 µl) betrug die Menge an SHP-1 50 ng (15 nM). Die Peptide wurden in ansteigenden Konzentrationen von 25 µM, 100 µM und 500 µM zugegeben. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl 1 N NaOH. Die kolorimetrische Messung des gebildeten p-Nitrophenols wurde mit einem Plattenlesegerät durchgeführt. Die Auswertung erfolgte Computer-gestützt. Berechnet wurden sowohl die durch Stimulierung mit den Peptidliganden erhaltenen Aktivitätswerte der SHP-1 als auch deren relative Stimulierung, wobei die Grundaktivität gleich 1 gesetzt wurde. Die Basalaktivität ist der Mittelwert aus 10 Einzelmessungen, alle anderen Messungen wurden dreifach durchgeführt.

### 6.3.8 Zellkluster Bildung (Focus formation Assay)

In diesem Test soll die Beeinflussung der intramolekularen Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 durch internalisierte Phosphopeptid-Liganden für deren N-terminale SH2-Domäne untersucht werden. Die Aktivierung der SHP-1 über die SH2-Domäne sollte dabei eine Klusterbildung verhindern, eine Hemmung der SHP-1 die Klusterbildung begünstigen. Der Versuch wurde analog der Vorschrift von KEILHACK *et al.* [188] durchgeführt. Dabei wurden folgende Abänderungen vorgenommen. Die Zellen wurden in Anwesenheit von NGFβ (50ng/ml) und der Ab- bzw. Anwesenheit von ATC (3ng/ml oder 100ng/ml) getestet. Da nach den in der Vorschrift vorgegebenen 12 Tagen die Focusbildung noch nicht deutlich genug zu sehen war, wurden die Zellen noch weitere zwei Tage mit frischem Medium, das die jeweiligen Zusätze enthielt, kultiviert. Folgende Oktapeptide wurden auf die Beeinflussung der Aktivität der SHP-1 untersucht: **OP 8**, **OP 11** und **OP 17**. Zur Internalisierung wurden 1µg des jeweiligen Peptides im Komplex mit 20 µl JBS Proteoducin eingesetzt. Die Bildung des nicht-kovalenten Komplexes zwischen dem jeweiligen Peptid und JBS-Proteoducin erfolgte entsprechen der Vorschrift der Jena Bioscience GmbH. Die Anfärbung der Zellen erfolgte mit Kristallviolett-Lösung entsprechend der Literaturvorschrift. Zur Dokumentation wurden die Zellen fotografiert.

## 7. Ergebnisse und Diskussion

Unter Nutzung der Röntgenstrukturanalysen der SHP-1 [98], der analogen Phosphatase SHP-2 [104] und der ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen an natürlichen und synthetischen Liganden wurden mittels eines Docking-Verfahrens [171] über das Rückgrat zyklisierte Liganden für die N-terminale SH2-Domäne modelliert. Diese sollten sich durch eine gute Passfähigkeit und Abbaustabilität auszeichnen. Die folgende Abbildung zeigt eine vorgeschlagene Struktur für Oktapeptide mit Rückgratzyklisierung.

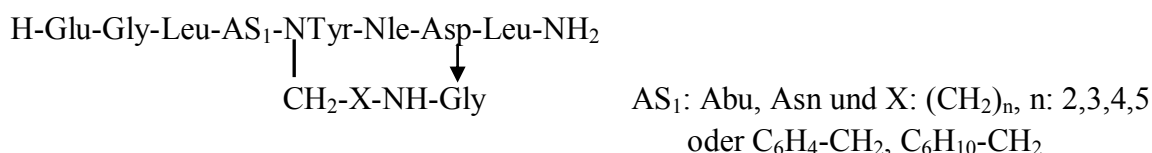
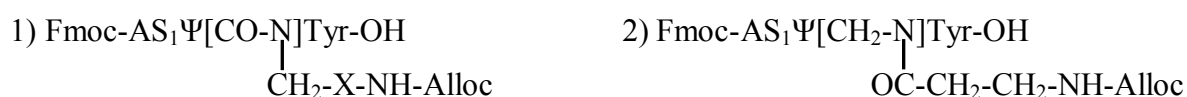


Abb. 16: Vorgeschlagene Grundstruktur eines zyklischen Oktapeptides

Die Rückgratzyklisierung ist eine Methode zur Stabilisierung der bioaktiven Konformation von Peptiden, ohne dabei die für die Wechselwirkung mit funktionellen Proteinen wesentlichen Seitenketten der Aminosäuren zu beeinträchtigen. Aufbauend auf vorhandene Erfahrungen in der Jenaer Gruppe [7, 172, 173] und Literaturbefunden [166] wurden dazu N-Alkyl-Aminosäuren und Pseudodipeptide synthetisiert. Da es nicht möglich war, am Amino-Stickstoff funktionalisierte Derivate von Phospho-Tyrosin mit oder ohne Schutzgruppe am Phosphatrest zu erhalten, musste das Risiko eingegangen werden, die Oktapeptide mit freier phenolischer Hydroxylgruppe des Tyrosins aufzubauen und nachträglich die Phosphatgruppe einzuführen.

Bei dem stufenweisen Aufbau eines der geplanten Oktapeptide mit Rückgratzyklisierung an der Festphase gelang die Ankondensation von Fmoc-Asn(Trt)-OH oder Fmoc-Abu-OH an die N-alkylierte Aminosäure  $[\text{HN}(\text{CH}_2)_3\text{-NH-Alloc}]\text{Tyr}$  trotz wiederholter Kopplung nur zu 20%. Dies war eine Ursache für Fehlsequenzen im Oktapeptid, das nach dieser Methode aufgebaut worden war.

Um die Oktapeptide in besserer Ausbeute darstellen zu können, sollten deshalb die benötigten Dipeptidblöcke mit der N-Alkylaminosäure in Lösung oder am Harz vorgefertigt und zum Aufbau der Oktapeptide eingesetzt werden. Es sollte versucht werden, Pseudodipeptid-Bausteine folgender Grundstrukturen darzustellen. Die dazu gewählte Schutzgruppenstrategie basiert ebenfalls auf den Erfahrungen der Jenaer Peptidgruppe.



AS<sub>1</sub>: Abu, Asn; X: (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>; n: 2,3,4,5 oder C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>-CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>



## 7.1 Darstellung der N-Alkyl-Tyrosine

Die zum Aufbau der Oktapeptide benötigten geschützten N-Aminoalkyl-Tyrosin-Derivate wurden über reduktive Alkylierung der Aminosäure-tert-butylester synthetisiert. Die dazu benötigten Aldehyde wurden nach der Methode von Fehrentz und Castro [164] aus den N, O-dimethylhydroxamaten der Alloc-geschützten Aminocarbonsäuren der Alloc-NH-X-COOH durch Reduktion mit  $\text{LiAlH}_4$  hergestellt. Erste Synthesen, die mit dem Tyrosin-Derivat Tyr( $\text{Bu}^t$ )-OH mit Alloc- $\beta$ -Ala-Aldehyd durchgeführt wurden, ergaben Ausbeuten von weniger als 10%. Zusätzlich entstand als Nebenprodukt Dialkyl-tert-butyl-Tyrosin, das mittels HPLC und ESI-MS nachgewiesen wurde. Bessere Ausbeuten wurden mit dem Derivat Tyr( $\text{Bu}^t$ )-OBu $^t$  erhalten. So lagen die Umsätze dieses N-Alkyl-Tyrosin-Derivates mit unterschiedlichen Aldehyden der Grundstruktur Alloc-NH-( $\text{CH}_2$ ) $_n$ -CHO zwischen 60-75%.

Tab. 7: Am Tyrosin geschützte N-funktionalisierte Bausteine

Nr.	Baustein	t <sub>R</sub> (min)	Ausbeute (%)	DC		M	
				S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	ber.	gef.
7	$\begin{array}{c} \text{HNTyr}(\text{Bu}^t)\text{-OH} \\   \\ (\text{CH}_2)_3\text{NHAlloc} \end{array}$	16,5	10	0,31	0,35	397,1	$[\text{M}+\text{Na}]^+ 402,2$ $[\text{M}+\text{K}]^+ 418,1$
4	$\begin{array}{c} \text{HNTyr}(\text{Bu}^t)\text{-OBu}^t \\   \\ (\text{CH}_2)_3\text{NHAlloc} \end{array}$	29,1	50	0,42	0,53	434,55	$[\text{M}+\text{H}]^+ 435,7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ 457,2$
12	$\begin{array}{c} \text{HNTyr}(\text{Bu}^t)\text{-OBu}^t \\   \\ (\text{CH}_2)_4\text{NHAlloc} \end{array}$	29,08	51	0,46	0,53	448,2	$[\text{M}+\text{H}]^+ 449,5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ 471,5$
18	$\begin{array}{c} \text{HNTyr}(\text{Bu}^t)\text{-OBu}^t \\   \\ (\text{CH}_2)_5\text{NHAlloc} \end{array}$	31,9	55	0,54	0,51	462,5	$[\text{M}+\text{H}]^+ 463,8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ 485,9$
24	$\begin{array}{c} \text{HNTyr}(\text{Bu}^t)\text{-OBu}^t \\   \\ (\text{CH}_2)_6\text{NHAlloc} \end{array}$	33,4	65	0,57	0,74	476,5	$[\text{M}+\text{H}]^+ 477,2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ 500,2$
30	$\begin{array}{c} \text{HNTyr}(\text{Bu}^t)\text{-OBu}^t \\   \\ \text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_{10}\text{-CH}_2\text{NHAlloc} \end{array}$	34,3	55	0,78	0,86	501,5	$[\text{M}+\text{H}]^+ 502,2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ 524,3$
36	$\begin{array}{c} \text{HNTyr}(\text{Bu}^t)\text{-OBu}^t \\   \\ \text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-(CH}_2)_2\text{NHAlloc} \end{array}$	34,5	50	0,52	0,74	510,5	$[\text{M}+\text{H}]^+ 511,4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ 533,6$

## 7.2 Darstellung der Pseudodipeptide

### 7.2.1 Ankondensation von Fmoc-Abu-OH an N-Alkyl-Tyrosine

Die Ankondensation einer sperrigen Aminosäure an N-Aklyl-Tyrosin ist ein schwieriger Syntheseschritt. Deshalb wurden Pseudodipeptide nach verschiedenen Methoden (Tab. 8) in Lösung hergestellt und wie normale Aminosäurederivate zur Festphasensynthese eingesetzt. Dadurch sollte die Kopplungsausbeute erhöht werden.

Tab. 8: Ankondensation von Fmoc-Abu an N-funktionalisierte Tyrosin-Derivate

Kopplung von Abu	Reaktionsbedingungen				Ausbeute %	
Fmoc-Abu-F (2 Äqu.) <sup>*</sup>	sym. Collidin (1,9 Äqu.)	DCM	4 h	65°C	10	
Fmoc-Abu-F (2 Äqu.) <sup>*</sup>	DIPEA (1 Äqu.) BTSA (2 Äqu.)	DCM	4 h	RT	28	
Fmoc-Abu-Cl (1,5 Äqu.) <sup>*</sup>	DIPEA (3 Äqu.) BTSA (2 Äqu.)	DCM	16 h	RT	5	
Fmoc-Abu-OH (1,5 Äqu.) <sup>*</sup>	DIPEA (3 Äqu.) TFFH (1,5 Äqu.) HOAt (1,5 Äqu.)	DCM	4 h	RT	18	
Fmoc-Abu-OH (1,5 Äqu.) <sup>*</sup>	DIPEA (3 Äqu.) TFFH (1,5 Äqu.)	DMF	4 h	RT	70	
Fmoc-Abu-F (2 Äqu.) <sup>**</sup>	DIPEA (2 Äqu.) BTSA ( 3 Äqu.)	DCM	4 h	RT	9	

<sup>\*</sup>Ankondensation an HN[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-AlLOC]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> (1 Äqu.)

<sup>\*\*</sup>Ankondensation an HN[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-AlLOC]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH (1 Äqu.)

Entsprechend der Literatur [174] wurde ein Fmoc-geschütztes Aminobuttersäure-Halogenid (Chlorid oder Fluorid) an das N-funktionalisierte Tyrosin-Derivat  $\text{HN}[(\text{CH}_2)_3\text{-NH-Alloc}]\text{Tyr}(\text{Bu}^t)\text{-OBu}^t$  ankondensiert. Die Fmoc-Aminobuttersäure-fluoride wurden analog einer Literaturvorschrift [175] dargestellt und mit dem Tyrosin-Derivat umgesetzt. Da die Ausbeute dabei in Übereinstimmung mit der Literatur [176] für Fluoride besser war, wurden diese sowohl für Synthesen in Lösung als auch an der festen Phase eingesetzt.

Bei der Ankondensation an  $\text{HN}[(\text{CH}_2)_3\text{-NH-Alloc}]\text{Tyr}(\text{Bu}^t)\text{-OBu}^t$  betrug die Ausbeute jedoch weniger als 10%. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das geschützte N-AlkylTyrosin-Derivat bei Raumtemperatur über Nacht mit Bis(trimethyl) silylacetamide behandelt. Die dabei gebildete N-Si-Bindung bewirkt ebenfalls eine Aktivierung am Stickstoff. Die durch das Silylieren erhöhte Nukleophylie ist von Schwarz et al. [156] für die Ankondensation der Säure-Chloride beschrieben worden. Unter Verwendung dieser Bedingungen wurde die Ausbeute bei der Ankondensation von Fmoc-Abu-F bis auf 28% erhöht.

Tab. 9: Fmoc-geschützte Pseudodipeptide mit geschützter phenolischer Hydroxyl- und Carboxylgruppe

Nr.	Pseudodipeptide	t <sub>R</sub> min	Ausbeute %	DC		M	
				S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	ber.	gef.
<b>5</b>	$\text{Fmoc-Abu}\Psi[\text{CO-N}]\text{Tyr}(\text{OBu}^t)\text{-OBu}^t$   $(\text{CH}_2)_3\text{NHAlloc}$	55,5	70	0,65	0,8	741,4	$[\text{M}+\text{H}]^+ 742,9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ 764,2$
<b>13</b>	$\text{Fmoc-Abu}\Psi[\text{CO-N}]\text{Tyr}(\text{OBu}^t)\text{-OBu}^t$   $(\text{CH}_2)_4\text{NHAlloc}$	56,4	70	0,65	0,8	755,4	$[\text{M}+\text{H}]^+ 756,4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ 778,3$
<b>19</b>	$\text{Fmoc-Abu}\Psi[\text{CO-N}]\text{Tyr}(\text{OBu}^t)\text{-OBu}^t$   $(\text{CH}_2)_5\text{NHAlloc}$	57,7	95	0,72	0,81	769,4	$[\text{M}+\text{H}]^+ 770,5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ 792,8$
<b>25</b>	$\text{Fmoc-Abu}\Psi[\text{CO-N}]\text{Tyr}(\text{OBu}^t)\text{-OBu}^t$   $(\text{CH}_2)_6\text{NHAlloc}$	59,1	90	0,75	0,85	783,3	$[\text{M}+\text{H}]^+ 784,9$ $[\text{M}+\text{K}]^+ 822,6$
<b>31</b>	$\text{Fmoc-Abu}\Psi[\text{CO-N}]\text{Tyr}(\text{OBu}^t)\text{-OBu}^t$   $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_{10}\text{-CH}_2\text{-NHAlloc}$	59,4	80	0,75	0,9	808,3	$[\text{M}+\text{H}]^+ 809,2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ 831,6$

Ausbeute: Angabe entspricht der Menge an Rohprodukt nach Flash-Chromatographie.

Zur Optimierung der Synthese des Pseudodipeptides wurde die Fmoc-Aminobuttersäure auch mit anderen Kopplungsreagenzien aktiviert. Die Aktivierung der Carboxyl-Gruppe von Fmoc-Abu mit TFFH und HOAt unter Zusatz von DIPEA als Base führt zur Bildung von Fmoc-Abu-OAt, das dann mit dem geschützten N-alkyl-Tyrosin-Derivat umgesetzt wird. Die

Optimierung der Synthesen der Pseudodipeptide ist abhängig von der anzukondensierenden Aminosäure und schließt die Wahl des geeigneten Kopplungsreagenzes, der Base und des Lösungsmittels ein. Da der Einsatz von TFFH als Aktivierungsmittel und DMF als Lösungsmittel bei dem Testpeptid die höchsten Ausbeuten ergaben, wurde diese Strategie auch für die Synthese der Pseudodipeptide **5**, **13**, **19**, **25** und **31** (Tab. 9) angewandt. Die Reinigung der Produkte erfolgte mittels Flash-Chromatographie. Außer Nebenprodukten wurde dabei besonders der zur Erzielung guter Ausbeuten eingesetzte hohe Überschuss an Fmoc-Abu abgetrennt. Folgender Lösungsmittel-Gradient ergab dabei die besten Trennergebnisse: Essigester/Hexan (2:98, 300 ml; 10:90, 400 ml; 30:70, 400 ml; 40:60, 300 ml; 50:50, 400 ml; 70:30, 300 ml; 90:10, 400 ml; 100:0, 500 ml).

Zur Darstellung kopplungsfähiger Pseudodipeptide mussten die tert.-Butyl-Gruppen durch Behandeln mit 50% TFA/DCM entfernt werden. Die Reinigung der freien Pseudodipeptide erfolgte ebenfalls durch Flash-Chromatographie mit einem Essigester:Hexan-Gradienten (5:5, 500 ml; 9:1, 1000 ml und 10:0, 600 ml). Die Pseudodipeptide wurden analytisch mittels -HPLC, ESI-S, DC und NMR charakterisiert (Tab. 10).

Tab. 10: Fmoc-geschützte Pseudodipeptide mit freier phenolischer Hydroxyl- und Carboxylgruppe

Nr.	Pseudodipeptide	Ausbeute %	t <sub>R</sub> min	DC		F.	M	
				S <sub>1</sub>	S <sub>3</sub>		ber.	gef.
<b>6</b>	Fmoc-AbuΨ[CO-N]Tyr-OH   (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHAlloc	50	32,7	0,45	0,40	110-113	629,4	[M+H] <sup>+</sup> 630,2 [M+Na] <sup>+</sup> 652,3
<b>47</b>	Fmoc-AsnΨ[CO-N]Tyr-OH   (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHAlloc	50	26,35	0,35	0,3	173-175	658,4	[M+H] <sup>+</sup> 659,4 [M+K] <sup>+</sup> 697,2
<b>14</b>	Fmoc-AbuΨ[CO-N]Tyr-OH   (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHAlloc	50	34,3	0,45	0,45	107-110	643,4	[M+H] <sup>+</sup> 644,1 [M+Na] <sup>+</sup> 666,2
<b>20</b>	Fmoc-AbuΨ[CO-N]Tyr-OH   (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> NHAlloc	90	35,7	0,55	0,45	101-104	657,4	[M+H] <sup>+</sup> 658,1 [M+Na] <sup>+</sup> 680,3 [M+K] <sup>+</sup> 696,2
<b>26</b>	Fmoc-AbuΨ[CO-N]Tyr-OH   (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> NHAlloc	90	35,7	0,55	0,50	125-127	671,3	[M+H] <sup>+</sup> 672,1 [M+Na] <sup>+</sup> 694,3
<b>32</b>	Fmoc-AbuΨ[CO-N]Tyr-OH   CH <sub>2</sub>   C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>   CH <sub>2</sub> -NHAlloc	75	37,7	0,6	0,55	117-121	696,5	[M+H] <sup>+</sup> 697,1 [M+Na] <sup>+</sup> 720,3

Ausbeute: Angabe entspricht Menge an Rohprodukt nach Flash-Chromatographie.

### 7.2.2 Versuche zur Darstellung von N-funktionalisierten Derivaten oder Pseudodipeptiden mit Phosphotyrosin

Diese Versuche wurden nur an der festen Phase unternommen, um die Phosphorylierung mehrfach wiederholen zu können und um hohe Überschüsse an Fmoc-geschützter Aminosäure zur Acylierung des N-Alkylderivates des Tyrosins einsetzen zu können. Um kopplungsfähige Pseudodipeptide gewinnen zu können, wurden die Darstellungsversuche an den säurelabilen SASRIN- und Cl-Trityl-Harzen unternommen. Am 2-Cl-Trityl-Chlorid-Harz kann weder mit Phosphotyrosin noch mit einem am Phosphatrest geschütztem Derivat durch reduktive Alkylierung eine ausreichende Menge an N-funktionalisiertem Phosphotyrosin gewonnen werden. Am SASRIN-Harz lieferte die reduktive Alkylierung schlechte Ausbeuten und die Dipeptidsynthese scheiterte an der ungenügenden Acylierung des N-Alkyl-Phosphotyrosins. Diese Misserfolge zwangen uns, die fertigen Oktapeptide nachträglich zu phosphorylieren.

### 7.2.3 Versuche zur Darstellung des Pseudodipeptides mit Asparagin

Da nur geringe Umsätze bei der Ankondensation von Fmoc-Asn(Trt)-OH oder Fmoc-Asn(Dmcp)-OH an das N-Alkyl-Tyrosin-Derivat  $[\text{HN}[(\text{CH}_2)_3\text{NHALloc}]\text{Tyr}(\text{Bu}^t)\text{-OH}$  **7** erreicht werden konnten, mussten andere Darstellungs-Möglichkeiten erprobt werden. Die geringen Ausbeuten sind wahrscheinlich auf die sterische Hinderung durch die große Tritylgruppe zurück zu führen. Aber auch durch die Verwendung von Seitenketten-ungeschütztem Asparagin-Pentafluorphenylester (Fmoc-Asn-OPfp) wurde keine signifikante Verbesserung (Tab. 11) beobachtet. Um die Ausbeuten zu erhöhen wurden die Synthesen in Lösung unter Verwendung einer Mikrowelle durchgeführt.

#### *Einsatz der Mikrowelle*

Das Interesse an der Beschleunigung der Reaktionen durch die Mikrowelle entwickelte sich in den frühen 1990er Jahren [177]. Die Peptidsynthese unter Verwendung einer Mikrowelle wurde zur Verkürzung der Reaktionszeit (von 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur auf 6 Minuten bei 60 °C) und zur Erhöhung der Kopplungseffizienz sterisch gehinderter Aminosäuren [178] genutzt. Außerdem sind eine erhöhte Reinheit sowie eine Unterdrückung der Racemisierungen zu beobachten. Die beschriebenen Vorzüge der Mikrowelle veranlassten uns, auch das N-Alkyl-Tyrosin-Derivat **7** mit Fmoc-Asn-OPfp unter Verwendung einer Mikrowelle mit 80 Watt bei 50 °C in 2 Stunden umzusetzen. Aber auch trotz Verwendung einer Mikrowelle war die Ankondensation unvollständig.

Tab. 11: Angewandte Reaktionsbedingungen zur Kopplung von Fmoc-Asn-OH  
an HN[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc]Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH **7**

Asn-Derivat	Reaktionsbedingungen	Zeit h	Ausbeute %
Fmoc-Asn-OPfp (2 Äqu.)	DIPEA (2 Äqu.), DMF, RT	18	0
Fmoc-Asn-OPfp (2 Äqu.)	DIPEA (2 Äqu.), DMF, 50°C, Mikrowelle (80 Watt)	2	20
Fmoc-Asn-OPfp (2 Äqu.)	DIPEA (2 Äqu.), BTSA (2 Äqu.), DMF, 50°C, Mikrowelle (80 Watt)	2	15
Fmoc-Asn-OPfp (2 Äqu.)	TEA (2 Äqu.), BTSA (2 Äqu.), DMF, 50°C, Mikrowelle (80 Watt)	2	22
Fmoc-Asn(Trt)-OH (1,25Äqu.)	DIPEA(2.5 Äqu.), TFFH (1.25 Äqu.), HOAt (1.25 Äqu.), DMF, RT , BTSA (4 Äqu.)	4	9

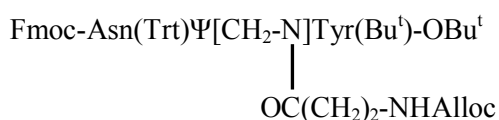
## 7.2.4 Darstellung von Pseudodipeptiden am Harz

### 7.2.4.1 Synthese von Fmoc-Asn(Trt)Ψ[CO-N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-Alloc]Tyr(OH)-OH

Die Versuche, dieses Pseudodipeptid in Lösung aufzubauen, scheiterten an den zu geringen Umsätzen bei der Acylierung des N-Alkyltyrosins und an der fehlenden Möglichkeit zur Abtrennung der Ausgangs- und Nebenprodukte. Deshalb wurde die Darstellung am säurelabilen SASRIN-Harz erprobt. Die Ankondensation von Fmoc-Asn(Dmcp)-OH oder Fmoc-Asn(Trt)-OH konnte dabei mehrfach wiederholt werden und lieferte dadurch Ausbeuten von über 50%, die durch weitere Aufreinigung das Produkt in genügender Menge und Reinheit lieferten.

### 7.2.4.2 Versuche zur Darstellung eines Pseudodipeptides mit reduzierter und acylierter Peptidbindung zwischen Asparagin und Tyrosin

Die reduzierte Peptid-Bindung wird häufig für Pseudodipeptid-basierte Enzyminhibitoren und Hormon-Antagonisten angewandt. Die reduzierte Peptid-Bindung besitzt eine erhöhte Flexibilität und Resistenz gegen den enzymatischen Abbau. Um zu alternativen Pseudodipeptid-Strukturen zu kommen, wurde versucht Pseudodipeptide mit einer reduzierten Bindung zwischen Asparagin und Tyrosin herzustellen.



Die Darstellung von Fmoc-Asn(Trt)-H erfolgt analog zu den oben beschriebenen Methoden für die Aldehyde. Fmoc-Asn(Trt)-H bei -30 °C unter Argon. Die Bildung der Schiffsschen Base mit dem Tyrosin-Derivat und deren Reduktion erfolgten „wie üblich“. Alle Reaktionsschritte wurden mittels HPLC, TLC und ESI-MS analytisch untersucht. Die Ausbeute betrug 80 %. Im Gegensatz zur leichten Bildung der reduzierten Peptidbindung gestaltete sich die Ankondensation von Alloc-βAla-OH an die reduzierte Peptidbindung jedoch sehr schwierig. Weder die DCC-vermittelte Acylierung noch die Aktivierung mit Chlorameisensäureisobutylester oder die Aktivierung mit TFFH, HATU und PyBOP bzw. der Einsatz des stark aktivierten Pentafluorphenylester Alloc-β-Ala-OPfp führten zur Bildung lohnenswerter Mengen des alternativen Pseudodipeptid-Blockes. Dieses Ergebnis stimmt mit einigen Literaturbefunden überein [172, 179, 180, 181].

### 7.3 Lineare Oktapeptide

In einer ersten Serie von linearen Peptidliganden wurden in die Position pY-1, pY-2 und pY+2 nichtproteinogene Aminosäure eingebaut. Dadurch konnte in einigen Fällen die Affinität zur SH2-Domäne erhöht werden. Es zeigte sich aber, dass die Affinität zur Domäne und die Aktivierung der Phosphatase nicht parallel verlaufen. Proteolytische Enzyme der Zellen können Peptide mit nichtproteinogenen Aminosäuren nur schwer spalten.

In die Positionen pY+1 und pY+3 wurden in der Literatur nur hydrophobe Aminosäuren eingebaut. Wir bevorzugten in diesen Positionen β-Phenylserin [Ser(βPh)]. Es handelt sich dabei um eine nichtproteinogene Aminosäure, deren stabilisierende Funktion schon an anderen Peptiden erprobt worden war [182]. Diese Aminosäure hat zwei chirale Zentren und kann deshalb in der *threo*- und *erythro*-Form vorkommen. Von beiden Formen gibt es darüber hinaus die D- und L-Konfigurationen. Da zur Synthese ein Razemat der *threo*-Form eingesetzt wurde, erfolgte eine Auftrennung erst auf der Stufe der fertigen Peptide mittels HPLC.

#### 7.3.1 Darstellung und Charakterisierung der linearen Oktapeptide

Die Synthese der Oktapeptide **OP 1** bis **OP 6** wurden nach der Fmoc-Strategie unter Verwendung von Rink-Amid-MBHA-Harz (Beladung 0.73 mmol/g) als polymerem Träger durchgeführt. Als geeignetes Kopplungsreagenz für das an dem Phosphatrest ungeschützte Phosphotyrosin und auch für die anderen Aminosäuren wurde HBTU zusammen mit HOBt verwendet. Im Falle der biotinylierten Peptidsequenzen wurde für die Ankondensation des Biotins PyBOP verwendet [183].

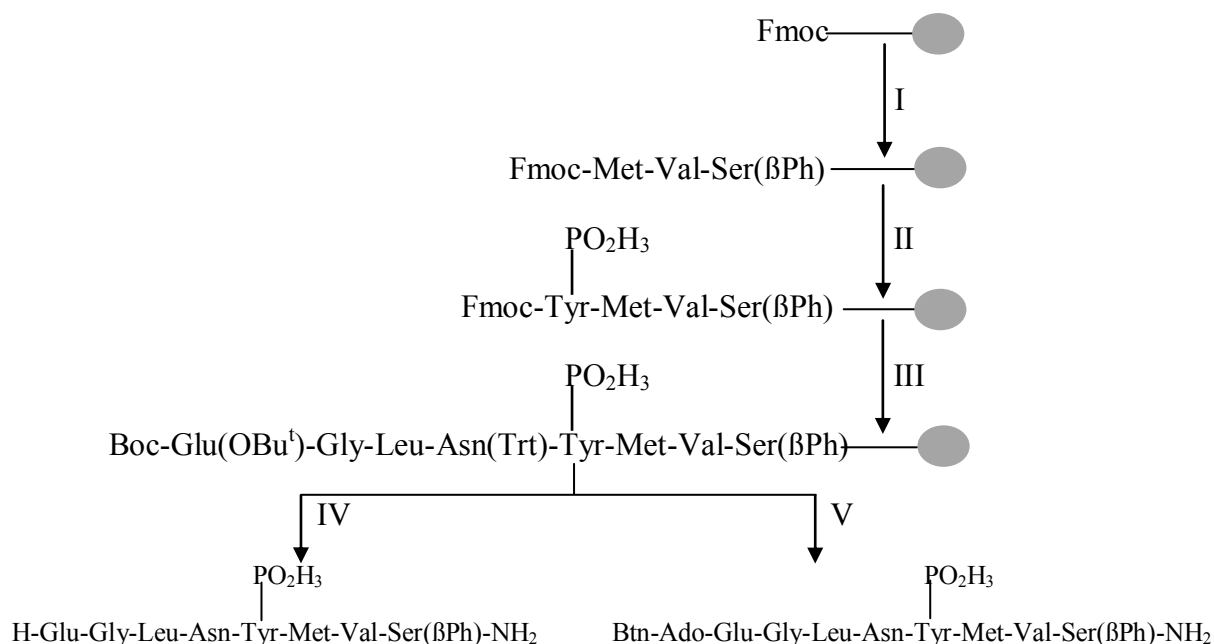


Abb. 17: Syntheschema zur Darstellung der linearen Phosphopeptide (**OP 5** und **OP 6**)

- I) 20% Piperidin /DMF, 4 Äqu. Aminosäure, 4 Äqu. HBTU, 4 Äqu. HOBT, 8 Äqu. DIPEA/DMF  
 II) 20% Piperidin /DMF, 4 Äqu. Fmoc-Tyr(PO<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 4 Äqu. HBTU, 4 Äqu. HOBT, 8 Äqu. DIPEA/DMF  
 III) 20% Piperidin /DMF, 4 Äqu. Aminosäure, 4 Äqu. HBTU, 4 Äqu. HOBT, 8 Äqu. DIPEA/DMF  
 IV) 20% Piperidin/DMF, 95% TFA/2,5% TIS/2,5% H<sub>2</sub>O  
 V) 20% Piperidin/DMF, Fmoc-Ado/HBTU/HOBT/2 Äqu. DIPEA/DMF, 20% Piperidin/DMF, Biotin/PyBOP/DIPEA/DMF, 95% TFA/2,5% TIS/2,5% H<sub>2</sub>O

Die Rohprodukte der Peptide wurden nach Abspaltung vom Harz mittels HPLC und MALDI-MS untersucht. Die analytische HPLC der Rohprodukte **OP 3** bis **OP 6** verdeutlichte, dass der Einbau von Ser(βPh) als Diastereomeren-Gemisch die Bildung mehrerer Peaks mit klar differenzierten Retentionszeiten verursachte. Die Ausbeuten an Rohprodukten lagen zwischen 55%-85%. Die Reinigung erfolgte durch semipräparative HPLC. Die Ergebnisse der Charakterisierung der Peptide durch MALDI-MS und HPLC sind in Tabelle 12 dargestellt. Um für die Synthese der rückgatzyklisierten Oktapeptide eine optimierte Strategie zu finden, wurde das lineare Oktapeptid **OP 7** auf vier unterschiedlichen Wegen am Harz aufgebaut. Dazu wurden die Syntheseverläufe verglichen und die erhaltenen Rohprodukte analysiert. Die erprobten Synthesestrategien unterschieden sich in Folgendem:

- 1) Einbau von ungeschütztem Tyrosin **III**
- 2) Einbau von geschütztem Tyrosin **IV**.
- 3) Ankondensation des Asparagins an das Tyrosin-Peptid-Harz mit TFFH
- 4) Ankondensation des Asparagins an das Tyrosin-Peptid-Harz als Pentafluorphenylester.



Tab. 12: Charakterisierung der linearen Phosphopeptide

Nr.	Peptidsequenz	t <sub>R</sub> min	M	
			ber.	gef.
<b>OP 1</b>	H-Glu-Gly-Leu-Asn-pTyr-Met-Val-Leu-NH <sub>2</sub>	20,6	1016,4	[M+H] <sup>+</sup> 1016,8
<b>OP 2</b>	Btn-Ado-Glu-Gly-Leu-Asn-pTyr-Met-Val-Leu-NH <sub>2</sub>	20,62	1388,8	[M+K] <sup>+</sup> 1427,7
<b>OP 3-a</b>	EGLNpY- <b>L-threo-Ser</b> (βPh)-VL-NH <sub>2</sub>	22,2	1049,1	[M+H] <sup>+</sup> 1050,2
<b>OP 3b</b>	EGLNpY- <b>D-threo-Ser</b> (βPh)-VL-NH <sub>2</sub>	25,9	1049,1	[M+H] <sup>+</sup> 1050,2
<b>OP 4a</b>	Btn-Ado-EGLNpY- <b>L-threo-Ser</b> (βPh)-VL-NH <sub>2</sub>	30,9	1421,4	[M+K] <sup>+</sup> 1459,6
<b>OP 4b</b>	Btn-Ado-EGLNpY- <b>D-threo-Ser</b> (βPh)-VL-NH <sub>2</sub>	33,1	1421,4	[M+Na] <sup>+</sup> 1443,5
<b>OP 5a</b>	EGLNpYMV- <b>L-threo-Ser</b> (βPh)-NH <sub>2</sub>	21,3	1066,4	[M+H] <sup>+</sup> 1067,9
<b>OP 5b</b>	EGLNpYMV- <b>D-threo-Ser</b> (βPh)-NH <sub>2</sub>	22,7	1066,4	[M+Na] <sup>+</sup> 1090,2
<b>OP 6a</b>	Btn-Ado-EGLNpYMV- <b>L-threo-Ser</b> (βPh)-NH <sub>2</sub>	22,8	1436,8	[M+Na] <sup>+</sup> 1459,6
<b>OP 6b</b>	Btn-Ado-EGLNpYMV- <b>D-threo-Ser</b> (βPh)-NH <sub>2</sub>	23,8	1436,8	[M+Na] <sup>+</sup> 1460,0

Die Synthesen wurden nach der Fmoc-Strategie unter Verwendung von Rink-Amid-MBHA-Harz (Beladung 0.73 mmol/g) durchgeführt. Um die Beladung des Harzes zu reduzieren, erfolgte die Ankondensation der C-terminalen Aminosäure Leu nur mit 1 Äqu. Fmoc-Leu-OPfp. Danach wurde mit Z(2-Cl)-OSu gekappt. In den Syntheseschritten **III**, **VI** und **VII** wurde TFFH als Kopplungsreagenz benutzt. Die anderen Fmoc-Aminosäuren wurden als Pentafluorphenylester ankondensiert.

Für die Synthese von Phosphopeptiden gibt es zwei Möglichkeiten [169]:

- 1) Einbau von geschützten Phosphotyrosinbausteinen (wie bei **OP 1** bis **OP 6**).
- 2) Einbau von an der phenolischen Hydroxylgruppe ungeschütztem Tyrosin und nachträgliche globale Phosphorylierung an der festen Phase (wie bei **OP 7** und **OP 8**).

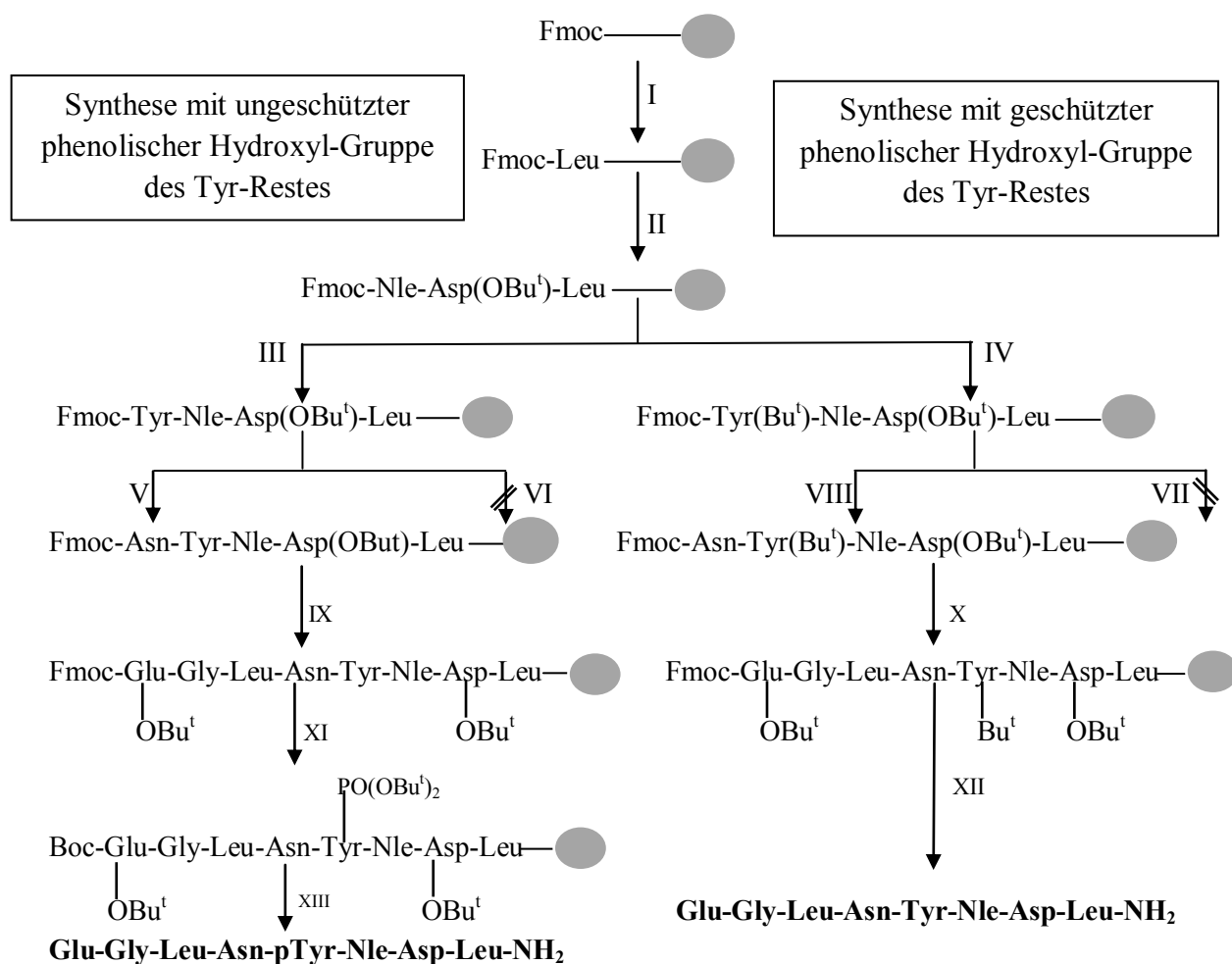


Abb. 18: Synthese der Oktapeptides **OP 7** und **OP 9** auf unterschiedlichen Wegen

**I)** 1: 20% Piperidin/DMF, 1 Äqu. Fmoc-Leu-OPfp, 2 Äqu. DIPEA, 1 Stunde, 2: 5 Äqu. Z(2-Cl)-Osu, 10 Äqu. DIPEA. **II)** 20% Piperidin/DMF, 4 Äqu. Fmoc-Xx-OPfp [Xx; Asp(OBu<sup>t</sup>), Nle], 8 Äqu. DIPEA, 1 Stunde, zweimal gekoppelt. **III)** 20% Piperidin/DMF, 4 Äqu. Fmoc-Tyr-OH, 4 Äqu. TFFH, 8 Äqu. DIPEA, 1 Stunde, zweimal gekoppelt. **IV)** 20% Piperidin/DMF, 4 Äqu. Fmoc-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OPfp, 2 Äqu. DIPEA, 1 Stunde, zweimal gekoppelt. **V)** und **VIII)** 20% Piperidin/DMF, 4 Äqu. Fmoc-Asn-OPfp, 8 Äqu. DIPEA, 1 Stunde, zweimal gekoppelt. **VI)** 20% Piperidin/DMF, 4 Äqu. Fmoc-Asn-OH, 4 Äqu. TFFH, 8 Äqu. DIPEA 1 Stunde, zweimal gekoppelt. **VII)** 20% Piperidin / DMF, 4 Äqu. Fmoc-Asn-OH, 4 Äqu. TFFH, 8 Äqu. DIPEA, 1 Stunde, zweimal gekoppelt. **IX)** 20% Piperidin/DMF, 4 Äqu. Fmoc-Yy-OPfp [Yy; Leu, Gly, Glu(OBu<sup>t</sup>)], 8 Äqu. DIPEA, 1 Stunde, zweimal gekoppelt. **X)** 20% Piperidin/DMF, 4 Äqu. Fmoc-Yy-OPfp [Yy; Leu, Gly, Glu(OBu<sup>t</sup>)], 8 Äqu. DIPEA, 1 Stunde, 2 Kopplungen. **XI)** 20% Piperidin/DMF, 5 Äqu. (Boc)<sub>2</sub>O, 10 Äqu. DIPEA, 2 Stunden, 12 Äqu. Tetrazol, 4 Äqu. Di-tertbutyldiethyl-phosphoramidit, 4 Äqu. <sup>t</sup>BuOOH. **XII)** 20% Piperidin/DMF, 5 Äqu. (Boc)<sub>2</sub>O, 10 Äqu. DIPEA, 2 Stunden, 95%TFA, 2,5% Wasser, 2,5% TIS, 3 Stunden. **XIII)** 95% TFA, 2,5% Wasser, 2,5% TIS, 6 Stunden.

Die Syntheseverläufe wurden bei wesentlichen Schritten durch Bestimmung des Fmoc-Gehaltes sowie mittels analytischer HPLC und ESI-MS verfolgt. Die Änderung der Menge des Fmoc-Abspaltungsproduktes bei den einzelnen Schritten zeigt, dass bei Ankondensation von Fmoc-Asn mittels TFFH die Beladung erniedrigt wird. Der Einsatz von Tyrosin ohne Schutz der phenolischen Hydroxylgruppe erhöht vorübergehend die Beladung durch Ankondensation an diese Gruppe (Abb. 19). Der dabei gebildete Aminoacyl-phenylester wird allerdings durch Piperidin wieder gespalten. Durch diese basische Deacylierung kann auch auf diesem Wege ein sauberes Endprodukt erhalten werden.

Tab. 13 zeigt, dass die Peptide X bis XIII in guter Reinheit und Ausbeute dargestellt werden konnten. Aus dem Syntheseverlauf sowie der Reinheit und Ausbeute der Endprodukte kann geschlussfolgert werden, dass der Aufbau des linearen Oktapeptides am günstigsten mit Pentafluorphenylestern und Schutz der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyrosins erfolgt. Prinzipiell ist es aber auch möglich, die Synthesen ohne Schutz der phenolischen Hydroxylgruppe durchzuführen.

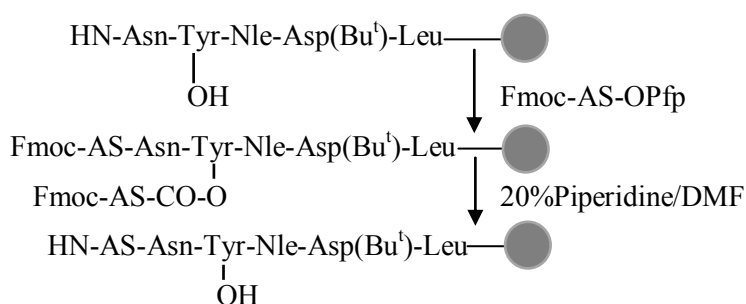


Abb. 19: Ankondensation und Wiederabspaltung der Fmoc-geschützten Aminosäure von der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyrosins.

Tab. 13: Analytik der Zwischenprodukte

Schritt	Peptidsequenz	t <sub>R</sub> min	M	
			ber.	gef.
II	Fmoc-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	33,9	580,3	[M+H] <sup>+</sup> 581,9 [M+K] <sup>+</sup> 619,7
III, IV	Fmoc-Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	32,5	743,8	[M+H] <sup>+</sup> 745,1 [M+Na] <sup>+</sup> 767,0
V	Fmoc-Asn-Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	28,4	857,9	[M+H] <sup>+</sup> 858,3 [M+Na] <sup>+</sup> 880,4
		31,9	1193,8	[M+H] <sup>+</sup> 1195,2 [M+K] <sup>+</sup> 1283,4

VIII	Fmoc-Asn-Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	28,4	857,9	[M+H] <sup>+</sup> 858,3 [M+Na] <sup>+</sup> 880,4
IX	Fmoc-Glu-Gly-Leu-Asn-Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	30,0	1156,3	[M+H] <sup>+</sup> 1157,7 [M+Na] <sup>+</sup> 1179,5
	freie phenolische Hydroxylgruppe			
	acylierte phenolische Hydroxylgruppe (Fmoc-Glu)	39,7	1507,8	[M+H] <sup>+</sup> 1508,6 [M+K] <sup>+</sup> 1546,5
X	Fmoc-Glu-Gly-Leu-Asn-Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	30,0	1156,3	[M+H] <sup>+</sup> 1157,7 [M+Na] <sup>+</sup> 179,7
XII	Glu-Gly-Leu-Asn-Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	13,6	934,1	[M+H] <sup>+</sup> 935,4 [M+Na] <sup>+</sup> 957,3
XIII	Glu-Gly-Leu-Asn- <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	9,3	1014,5	[M+H] <sup>+</sup> 1015,4 [M+Na] <sup>+</sup> 1037,6

System I, Gradient 2

Nach der Erarbeitung der prinzipiellen Strategie für die Synthese linearer und zyklischer Phosphotyrosin-Peptide wurden die linearen Peptide **OP 7**, **OP 8** und **OP 9** synthetisiert. Mit ihrer Hilfe sollte der Einfluss der Zyklisierung auf die proteolytische Stabilität und die biologische Aktivität untersucht werden, denn sie haben die gleiche Aminosäuresequenz wie die zyklischen Peptide. Die linearen Peptide wurden mit Fmoc-Aminosäure-Pentafluorphenylestern am Rink-Amid-MBHA-Harz (Beladung 0.73 mmol/g) aufgebaut

Tab. 14: Charakterisierung der linearen Oktapeptide

Nr.	Sequenz	HPLC(t <sub>R</sub> )		DC		M	
		semi.	anal.	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	ber.	gef.
<b>OP 7</b>	H-Glu-Gly-Leu-Asn- <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	16,6	19,3	0,40	0,35	1014,5	[M+H] <sup>+</sup> 1015,4 [M+Na] <sup>+</sup> 1037,5
<b>OP 8</b>	H-Glu-Gly-Leu-Abu- <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	22,2	21,3	0,40	0,30	985,5	[M+H] <sup>+</sup> 986,4 [M+Na] <sup>+</sup> 1008,5
<b>OP 9</b>	H-Glu-Gly-Leu-Abu-Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	25,3	23,9	0,44	0,38	906,6	[M+H] <sup>+</sup> 907,3 [M+Na] <sup>+</sup> 1031,8

HPLC-System II, Gradient 3, S<sub>6</sub>: n-Butanol:Eisessig. Wasser : 48:18:24 (v/v/v) und S<sub>7</sub>:

Pyridine:Essigester:Eisessig:Wasser : 5:5:1:1 (v/v/v/v)

Zur Darstellung der linearen Phosphopeptide wurden Di-tert-Butyl-Diisopropylphosphoramidit und 5-Benzyl-1H-thiotetrazol (Hyacinth BMT) als Katalysator sowie Cl-Perbenzoesäure als Oxidationsmittel eingesetzt.

Die analytische HPLC zeigt, dass die Ausbeute der Phosphorylierungsreaktion 95% beträgt. Nach Abspaltung der Peptide von Harz wurden die Rohprodukte mittels HPLC und ESI-MS untersucht. Die Ausbeute an Rohprodukten betrug bei den linearen Peptiden 60%-85%. Die Reinigung erfolgte durch semipräparative HPLC (JASCO). Die Ergebnisse der Charakterisierung der Peptide durch ESI-MS, DC und HPLC sind in Tab. 14 dargestellt.

## 7.4 Synthese der zyklischen Peptide

### 7.4.1 Versuche zur Darstellung von Liganden mit einer aromatischen Brücke in der Seitenkette

Abgeleitet aus einem Dockingmodell sollten konformationsstabilisierte Strukturen mit einer aromatischen Laktam-Brücke synthetisiert und auf die Aktivierung der Phosphatase untersucht werden. Dabei sollte als Vorlage die Struktur eines modellierten Liganden genutzt werden, der C-terminal zwischen den Resten pY+1 und pY+3 verbrückt ist. Die Zyklisierung wurde zwischen den Carboxylgruppen der Seitenketten von Asp bzw. Glu in den Positionen pY+1 und pY+3 sowie den Aminogruppen des Bausteines  $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$  versucht. Dafür war es notwendig, eine aromatische Aminogruppe des Bausteines zu schützen. Als Schutzgruppe wurde Alloc ausgewählt, weil sich die Alloc/OAll-Kombination bereits in anderen Seitenketten-zyklisierten Peptiden bewährt hatte [183]. Die geplanten Peptide konnten jedoch nicht dargestellt werden. Die gefundene Entstehung einer großen Anzahl von Nebenprodukten ist wahrscheinlich auf die Abspaltung des Alloc-Restes von der aromatischen Aminogruppe mit Piperidin und die nachfolgende Tetramethyl-Guanylierung durch TBTU zurückzuführen, wie sie in Abb. 20 dargestellt ist. Eine basische Abspaltung der Alloc-Gruppe von aromatischen Aminen war auch von Medzihradsky et al. [187] gefunden worden.

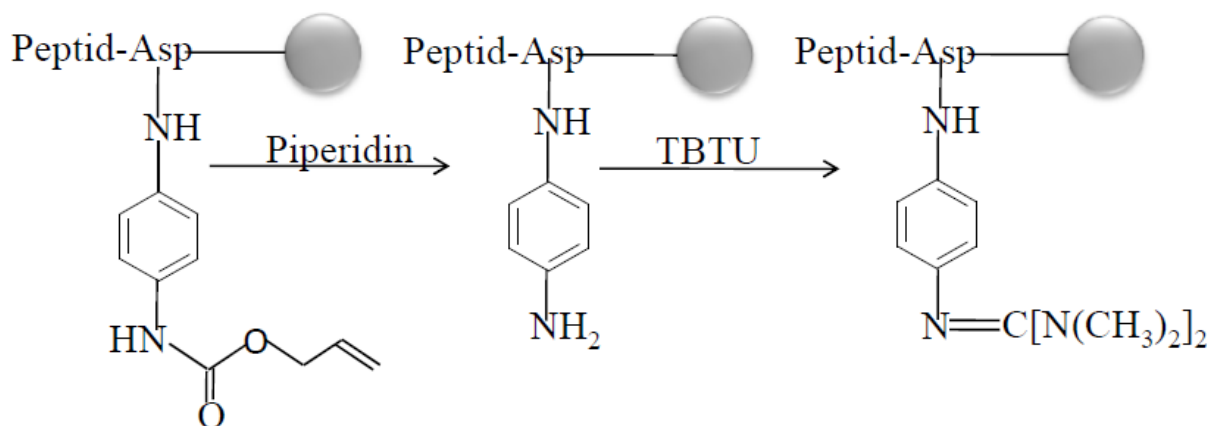


Abb.20: Mechanismus der Alloc-Abspaltung mit Piperidin und Tetramethylguanylierung mit TBTU

#### 7.4.2 Darstellung und Charakterisierung von Oktapeptidliganden mit aliphatischen und zykoaliphatischen Resten in der Laktambrücke

Die Synthese der Phosphopeptidliganden **OP 10** bis **OP 16** wurde unter Verwendung von Rink Amid-MBHA-Harz) als polymerem Träger durchgeführt. Um die intramolekulare Zyklisierung zu begünstigen, wurde die Beladung des Harzes niedrig gehalten. Um eine optimierte Strategie zu finden, erfolgte der Aufbau des Oktapeptides **OP 10** auf 3 verschiedenen Wegen. Die einzelnen Syntheseschritte wurden mittels analytischer HPLC, dem Kaiser-Test und quantitativer Fmoc-Bestimmung untersucht.

Der Aufbau des Harz-gebundenen Tripeptides Fmoc-Nle-Asp(Gly-OAll)-Leu bereitet bei Einsatz des Dipeptid-Blockes Fmoc-Asp(Gly-OAll)-OH keine Schwierigkeiten.

- *Strategie I:* Nach Ankondensation des Fmoc-geschützten N-Alkyltyrosin-Blockes an das Tripeptid bereitet die Kettenverlängerung mit geschütztem Asparagin große Schwierigkeiten. Das kann auf den sperrigen Trityl-Rest als Amid-Schutzgruppe für die Seitenkette des Asn zurückgeführt werden.
- *Strategie II:* Die Ankondensation des Fmoc-geschützten N-Alkyltyrosin-Blockes und die anschließende Phosphorylierung des Tetrapeptides führten auch bei dem Versuch der Kopplung der nicht sperrigen Aminosäure Abu zu einem Synthese-Abbruch.
- *Strategie III:* Die Ankondensation des vorgefertigten Pseudodipeptid-Bausteines **47** an das Harz-gebundene Tripeptid lieferte gute Ausbeuten und konnte an der jetzt wieder unsubstituierten Aminogruppe problemlos weiter verlängert werden (Abb. 21). Deshalb wurde diese Strategie für alle weiteren Synthesen angewandt.
- Eine Gefahr bei der Ankondensation von Dipeptiden, also auch von Pseudodipeptiden, besteht in der Razemisierung [5]. Wir gehen davon aus, dass auch bei unseren Synthesen unter Verwendung von PyBop/HOBt als Kopplungsreagenz für die Ankondensation des Pseudodipeptides Razemisierung auftrat.
- Die weiteren Aminosäuren wurden als Pentafluorphenylester eingesetzt: Fmoc-Leu-OPfp, Fmoc-Nle-OPfp und Fmoc-Gly-OPfp.
- Für die Darstellung der Oktapeptide mit freiem N-Terminus wurde Boc-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OH unter Verwendung PyBop/HOBt als Kopplungsreagenz angewandt.
- Die linearen Oktapeptide wurden mit 20% Piperidin in DMF behandelt, um das in einer Nebenreaktion an der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyrosins ankondensierte geschützte Glutaminsäure-Derivat wieder abzuspalten.
- Die Zyklisierung der Boc-geschützten Peptide erfolgte nach Entfernung der Alloc/OAll-Schutzgruppen mit PyBOP.

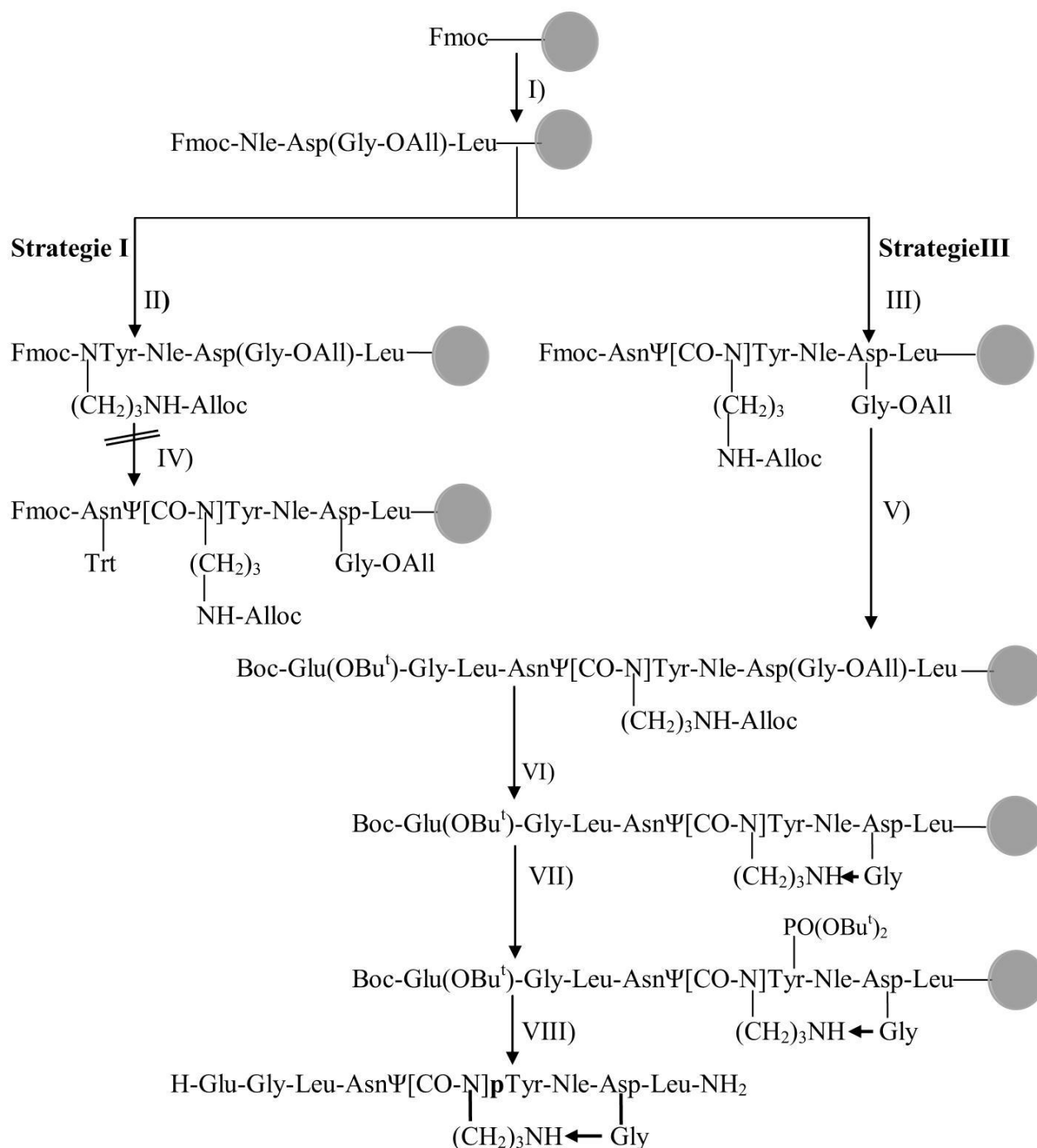


Abb. 21: Darstellung rückgratzyklisierter Phosphopeptidliganden

- I) 20 % Piperidin / DMF, Fmoc-Leu-OPfp, DIPEA, 20 % Piperidin/DMF, Fmoc-Asp(Gly-OAll)-OH, TFFH, DIPEA und 20 % Piperidin / DMF, Fmoc-Leu-OPfp, DIPEA.
- II) 20 % Piperidin / DMF, Fmoc-Nalkyltyrosin, TFFH, DIPEA.
- III) 20 % Piperidin / DMF, Pseudodipeptid, PyBop, HOBt, DIPEA.
- IV) 20 % Piperidin/DMF, Fmoc-Asn(Trt)-OH, TFFH, DIPEA.
- V) 20 % Piperidin/DMF, Fmoc-Leu-OPfp, DIPEA, 20% Piperidin /DMF, Fmoc-Gly-OPfp, DIPEA, 20% Piperidin / DMF, Boc-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OH, PyBop, HOBt und 20% Piperidin / DMF.
- VI) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, DMF/THF/0,5N HCl/Morpholin (2:2:1:0,9) und PyBOP/DIEA/DMF, PyBop, DIPEA.
- VII) Di-tert-Butyl-Diisopropylphosphoramidit, Hyacinth BMT, Cl-Perbenzoesäure.
- VIII) 95 % TFA/ 2,5 % H<sub>2</sub>O, 2,5 % TIS

Im Oktapeptid **OP 11** wurde Asparagin durch  $\alpha$ -Aminobuttersäure (Abu) ersetzt. Zur Optimierung der Ankondensation der Pseudipeptide mit Abu an das Harz-gebundene Tripeptid wurden verschiedene Kopplungsreagenzen verglichen. So wurde das Pseudodipeptid **6** unter Verwendung von PyBop/HOBt, PyBrop oder TFFH ankondensiert. Als Basen wurden Diisopropylethylamin (DIPEA) und sym. Collidin eingesetzt. Die analytische HPLC und der Kaiser-Test zeigten, dass PyBop/HOBt als Kopplungsreagenz und DIPEA als Base die besten Ergebnisse lieferten.

Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe sollte möglichst schonend durchgeführt werden. Deshalb wurden Abspaltungsversuche mit 2% DBU und 2% Piperidin in DMF durchgeführt. Die erhaltenen Produkte zeigten jedoch, dass DBU den Allylester von Gly hydrolysieren kann.

Wie Abb. 22 verdeutlicht, kann dadurch Aspartimid gebildet werden, das nicht für den Zyklisierungsprozess geeignet ist und zu weiteren Nebenreaktionen führen kann. In unseren Experimenten konnten wir einen beträchtlichen Anteil an Aspartimid nachweisen. Um diese Reaktion zu vermeiden und um trotzdem schonend abzuspalten, wurde die Abspaltungszeit mit 20% Piperidin/DMF reduziert.

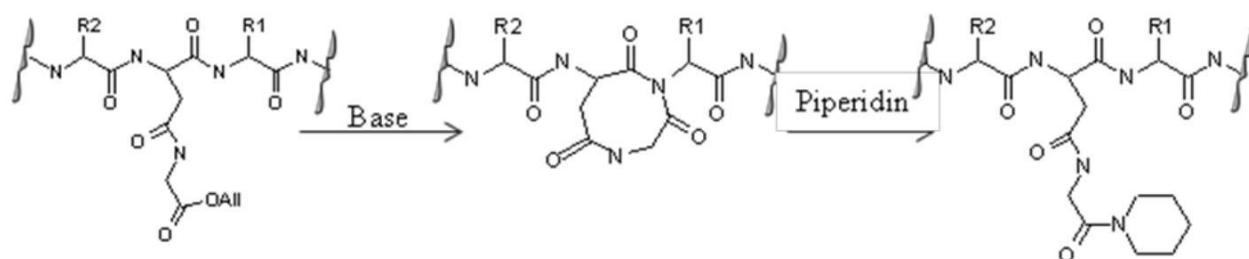


Abb. 22: Basen-induzierte Bildung von Aspartimid und Piperidid nach Dölling et al. [184]

Die Synthese der Phosphopeptideliganden **OP 11 bis OP 16** erfolgte wie bei **OP 10** beschrieben. Die Peptide wurden vom Harz abgespalten und analog den linearen Sequenzen mittels analytischer HPLC, ESI-MS und Dünnschicht-Chromatographie untersucht. Die Reinigung erfolgte durch semipräparative HPLC (JASCO). Die analytische Charakterisierung der Peptide ist in Tab. 15 zusammengestellt.



Tab. 15: Analytische Charakterisierung der zyklischen Oktapeptid-Liganden

Nr.	Peptidsequenz	t <sub>R</sub> min	DC		M	
			S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	ber.	gef.
<b>OP 10</b>	H-Glu-Gly-Leu-AsnΨ[CO-NH] <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}   \\ \text{(CH}_2\text{)}_3\text{-NH} \leftarrow \text{Gly} \end{array}</math> </div>	24,9*	0,6	0,69	1110,2 [M+H] <sup>+</sup>	1111,8 [M+Na] <sup>+</sup> 1132,8
<b>OP 11</b>	H-Glu-Gly-Leu-AbuΨ[CO-NH] <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}   \\ \text{(CH}_2\text{)}_3\text{-NH} \leftarrow \text{Gly} \end{array}</math> </div>	26,2*	0,65	0,74	1082,2 [M+H] <sup>+</sup>	1083,3 [M+Na] <sup>+</sup> 1105,3 [M+2H] <sup>++</sup> 542,3 [M+2Na] <sup>++</sup> 462,3
<b>OP 12</b>	H-Glu-Gly-Leu-AbuΨ[CO-NH]Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}   \\ \text{(CH}_2\text{)}_3\text{-NH} \leftarrow \text{Gly} \end{array}</math> </div>	29,1*	0,67	0,76	1002,4 [M+H] <sup>+</sup>	1003,5 [M+Na] <sup>+</sup> 1025,4 [M+2Na] <sup>++</sup> 524,1
<b>OP 13</b>	H-Glu-Gly-Leu-AbuΨ[CO-NH] <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}   \\ \text{(CH}_2\text{)}_4\text{-NH} \leftarrow \text{Gly} \end{array}</math> </div>	20,0** 21,2**	0,44	0,39	1095,5 [M+H] <sup>+</sup>	1096,4 [M+Na] <sup>+</sup> 1118,6 [M+2H] <sup>++</sup> 548,6 [M+2Na] <sup>++</sup> 571,0
<b>OP 14</b>	H-Glu-Gly-Leu-AbuΨ[CO-NH] <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}   \\ \text{(CH}_2\text{)}_5\text{-NH} \leftarrow \text{Gly} \end{array}</math> </div>	21,3** 21,9**	0,43	0,36	1109,4 [M+H] <sup>+</sup>	1110,6 [M+Na] <sup>+</sup> 1132,5 [M+2Na] <sup>++</sup> 577,7
<b>OP 15</b>	H-Glu-Gly-Leu-AbuΨ[CO-NH] <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}   \\ \text{(CH}_2\text{)}_6\text{-NH} \leftarrow \text{Gly} \end{array}</math> </div>	24,9**	0,47	0,45	1123,2 [M+H] <sup>+</sup>	1124,4 [M+Na] <sup>+</sup> 1146,5

<b>OP 16</b>	$\begin{array}{c} \text{H-Glu-Gly-Leu-Abu}\Psi[\text{CO-NH}] \text{pTyr-Nle-Asp-Leu-NH}_2 \\ \quad \quad \quad \downarrow \quad \quad \quad \downarrow \\ \quad \quad \quad \text{CH}_2 \quad \quad \quad \text{Gly} \\ \quad \quad \quad \downarrow \quad \quad \quad \downarrow \\ \quad \quad \quad \text{C}_6\text{H}_{10}\text{-CH}_2\text{-NH} \end{array}$	22,7**	0,52	0,40	1149,5 [M+H] <sup>+</sup> 1150,4 [M+Na] <sup>+</sup> 1172,6 [M+2Na] <sup>++</sup> 597,8
<b>OP 17</b>	$\begin{array}{c} \text{H-Glu-Gly-Glu-Abu}\Psi[\text{CH}_2\text{-NH}] \text{pTyr-Nle-Lys-Leu-NH}_2 \\ \quad \quad \quad \downarrow \quad \quad \quad \downarrow \\ \quad \quad \quad \text{CH}_2 \quad \quad \quad \text{Gly} \\ \quad \quad \quad \downarrow \quad \quad \quad \downarrow \\ \quad \quad \quad \text{C}_6\text{H}_{10}\text{-CH}_2\text{-NH} \end{array}$	14,4**	0,38	0,32	982,1 [M+H] <sup>+</sup> 982,4 [M+Na] <sup>+</sup> 1005,5

Die Retentionszeiten wurden in verschiedenen Systemen bestimmt: \*HPLC-System I, Gradient 2, \*\*HPLC-SystemII, Gradient 2

Eine Besonderheit stellt der Phosphopeptidligand **OP 17** dar. Mit diesem Peptid sollten Liganden mit einer alternativen Pseudopeptid-Struktur und umgekehrter Richtung der Laktam-Brücke erhalten werden.

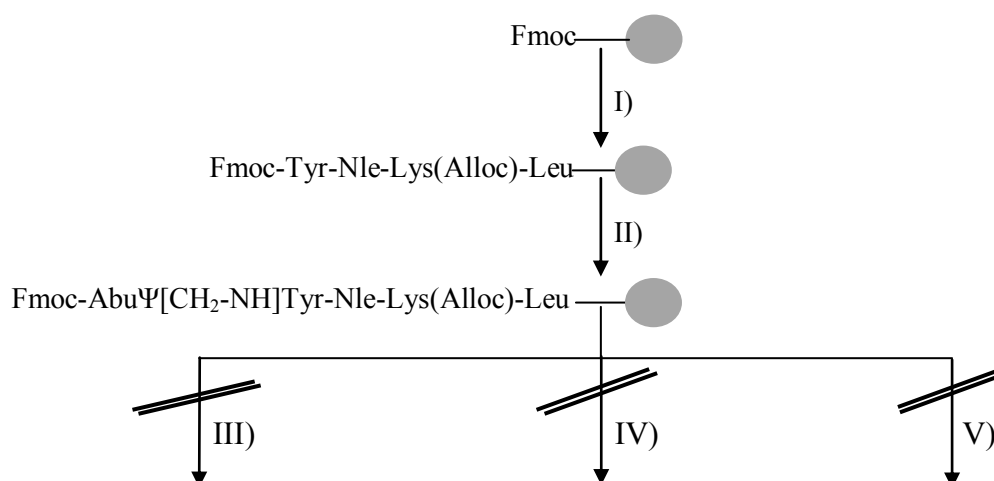


Abb. 23: Versuche zur Synthese von Liganden mit alternativer Pseudopeptid-Bindung am Harz

- i) 20% Piperidin/DMF, Fmoc-Leu-OPfp und DIPEA, Fmoc-AS-OH, PyBop/HOBt, DIPEA
- ii) 20% Piperidin/DMF, Fmoc-Abu-H, 2%CH<sub>3</sub>COOH/DMF, NaCNBH<sub>3</sub>
- iii) HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOAll, TFFH, DIPEA
- iv) AlLOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COF, DIPEA
- v) AlLOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COF, DIPEA, Mikrowelle

Die Synthese der reduzierten Peptidbindung erfolgte am Harz. Wie in der Literatur vorgeschlagenen [180], wurde ein Aldehyd (Fmoc-Abu-H **54**) an die Aminogruppe des Harz-

gebundenen Tyrosyl-Peptides ankondensiert und die dabei gebildete Azomethin-Gruppe mit  $\text{NaCNBH}_3$  reduziert. Um eine Rückgratzyklisierung durchführen zu können wurde versucht, Monoallyl-Bernsteinsäure oder Monoallyl-Malonsäure unter Verwendung TFFH als Kupplungsreagenz oder als Acyl Fluorid an die reduzierte Peptidbindung anzukoppeln. Trotz des Einsatzes eines großen Überschusses, mehrfach wiederholter Kopplungen und des Einsatzes der Mikrowelle gelang es nicht, einen zum Weiterarbeiten ausreichenden Acylierungsgrad der reduzierten Peptidbindung zu erreichen. Abb. 23.

Da eine Rückgratzyklisierung nicht möglich war, wurden Lys(Alloc) in Position pY+2 und Glu(OAll) in Position pY-2 eingebaut und eine Seitenkettenzyklisierung durchgeführt. Die Synthese erfolgte analog zu Oktapeptid **OP 10**. Die analytische Charakterisierung des Peptides ist in Tab. 15 enthalten.

## **7.5. Stabilität der linearen und zyklischen Oktapeptide gegenüber enzymatischem**

### **Abbau**

#### **7.5.1 Stabilität gegenüber ausgewählten Proteasen**

Eine der Zielstellungen dieser Arbeit war es, durch Zyklisierung, vor allem aber durch Rückgratzyklisierung, Phosphotyrosin-Peptide gegen den proteolytischen Abbau zu stabilisieren. Damit sollten Vorarbeiten für einen potentiellen Einsatz im Tierexperiment und in der Therapie geschaffen werden. Zur Bestimmung der Abbaustabilität ausgewählter Peptide wurden diese mit isolierten Enzymen bzw. einem Zellhomogenat (NIH 3T3-Zellen) inkubiert. Von den zahlreichen Proteasen wurden nur Chymotrypsin und Proteinase K ausgewählt, weil Chymotrypsin Spaltstellen hinter aromatischen und hydrophoben Aminosäure-Resten besitzt und Proteinase K mit hoher Aktivität aber unspezifisch spaltet. Aus einer Stabilität gegenüber Proteinase K könnte mit gewisser Vorsicht auf eine generelle Abbaustabilität geschlossen werden. Der Einsatz des Zellhomogenates diente der Untersuchung der Stabilität ausgewählter Peptide gegenüber membranständigen und zytosolischen Proteasen, um die Effektivität einer Internalisierung dieser Peptide zur Beeinflussung der intrazellulären Signaltransduktion abschätzen zu können. Untersucht wurde der Abbau mittels analytischer HPLC nach dem Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit HCl und nach Gefriertrocknung der Proben. Durch das notwendige Arbeiten mit Puffern und die Gefriertrocknung hatten die Auftragsproben eine hohe Salzkonzentration. Diese hat sowohl bei den linearen als auch bei den zyklischen Peptiden die Retentionszeiten verfälscht. Die Peptide werden 1 bis 3 Minuten später eluiert als die aus dem Anfangsgradienten aufgetragenen reinen Peptid-trifluoracetate. Ein Vergleich mit den reinen Peptiden ist deshalb nicht sinnvoll. Durch die Probenentnahme aus einer Inkubationslösung und das Abstoppen ist

eine Messung zum Zeitpunkt 0 Minuten nicht möglich. Das Herstellen der Inkubationslösung und die Probenentnahme erfordern einen Zeitaufwand von ca. 2 Minuten. Es muss außerdem beachtet werden, dass sowohl die eingesetzten Puffer als auch die Enzyme und das Homogenat zusätzliche Peaks verursachen. Bei den abgebildeten HPLC-Elutionsdiagrammen handelt es sich um Ausschnitte bzw. Ausschnittsvergrößerungen für einen bestimmten Retentions-Zeitraum. Einige Ausschnitte weisen keine scharfen Peaks auf, weil es sich um Vergrößerungen handelt.

#### 7.5.1.1 Abbau des linearen Phospho-Tyrosin Oktapeptides OP 8

Die Elutionsdiagramme zeigen, dass das lineare Oktapeptid **OP 8** durch beide Enzyme gespalten wird (Abb. 24, 25).

Der Abbau durch Chymotrypsin (Abb. 24) erfolgt erwartungsgemäß langsam. Es tritt bereits nach 2 Minuten ein erstes Spaltprodukt auf, nach 20 und 60 Minuten sind es zwei. Das lineare Oktapeptid ist aber auch nach 60 Minuten noch vorhanden. Es scheint, dass der Abbau bereits nach 20 Minuten zum Stehen gekommen ist. Eine nachträglich durchgeführte HPLC-Analyse (System III) des eingesetzten Peptides ergab, dass es einen Anteil an unphosphoryliertem Peptid enthielt. Dieses wird von Chymotrypsin gespalten, während in Übereinstimmung mit der Literatur [185] das phosphorylierte Peptid nicht gespalten wird.

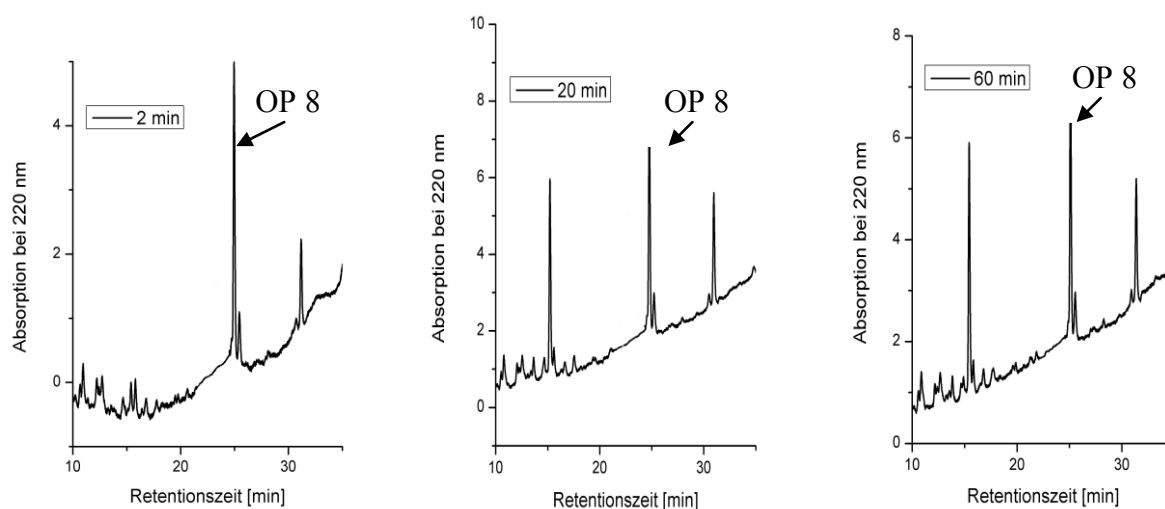


Abb. 24: Abbau des linearen Phospho-Tyrosin Oktapeptides **OP 8** durch Chymotrypsin;  
HPLC-System II, Gradient 3

Die Spaltung des Oktapeptides durch Proteinase K erfolgt viel schneller und vor allem vollständig. Bereits nach 20 Minuten ist kein **OP 8** ( $t_R = 25$  min) mehr vorhanden. Zwischenzeitlich treten 3 Spaltprodukte auf, die im weiteren Verlauf der Reaktion weiter

abgebaut werden. Wegen dieser hohen proteolytischen Aktivität wurde zur Untersuchung der Stabilität der zyklisierten Peptide vor allem Proteinase K eingesetzt.

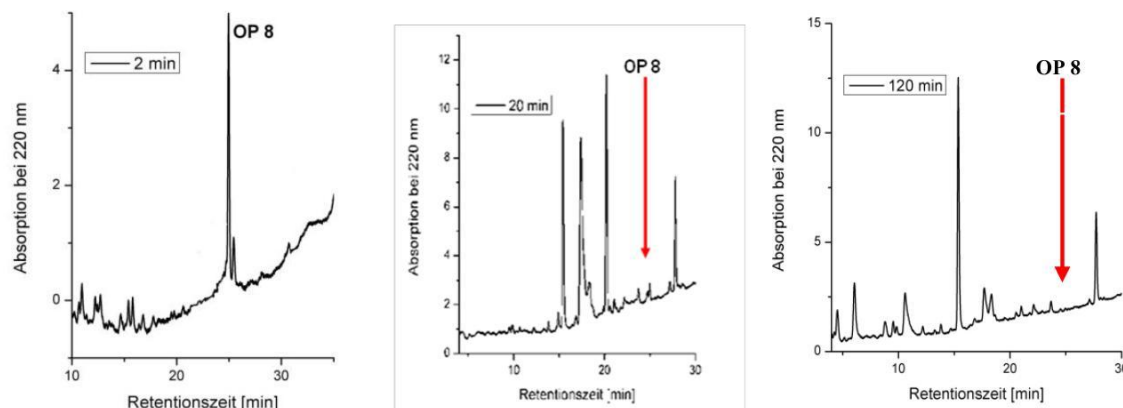


Abb. 25: Abbau des linearen Phospho-Tyrosin Oktapeptides **OP 8** ( $t_R = 25$  min) durch Proteinase K; HPLC-System II, Gradient 3

Um ausschließlich den proteolytischen Abbau des linearen Peptides durch das Zellhomogenat untersuchen zu können, wurde dem Ansatz  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  als Phosphatase-Inhibitor zugesetzt. Dieser Zusatz ist notwendig, da im Gegensatz zu den reinen Proteasen bei dem Homogenat auch mit einer Dephosphorylierung durch membranständige bzw. intrazelluläre Phosphatasen gerechnet werden muss. Im Gegensatz zu den reinen Proteasen erfolgt durch das Homogenat keine Spaltung des linearen Oktapeptides. Um dieses Ergebnis abzusichern wurden diese Messungen an zwei unterschiedlichen HPLC-Systemen (II und III) mit unterschiedlichen Gradienten durchgeführt (2 und 3).

#### 7.5.1.2 Abbau des Phospho-Tyrosin-Oktapeptides mit reduzierter Peptidbindung und Seitenketten-Zyklisierung **OP 17**

Die Stabilität dieses Peptides wurde nur gegen Proteinase K und das Zellhomogenat getestet. Die Abbildung 26 zeigt, dass **OP 17** 120 Minuten lang vollständig stabil gegenüber der sehr aktiven Proteinase K ist. Damit ist es auch für *in vivo*-Untersuchungen und Internalisierungs-Experimente geeignet.

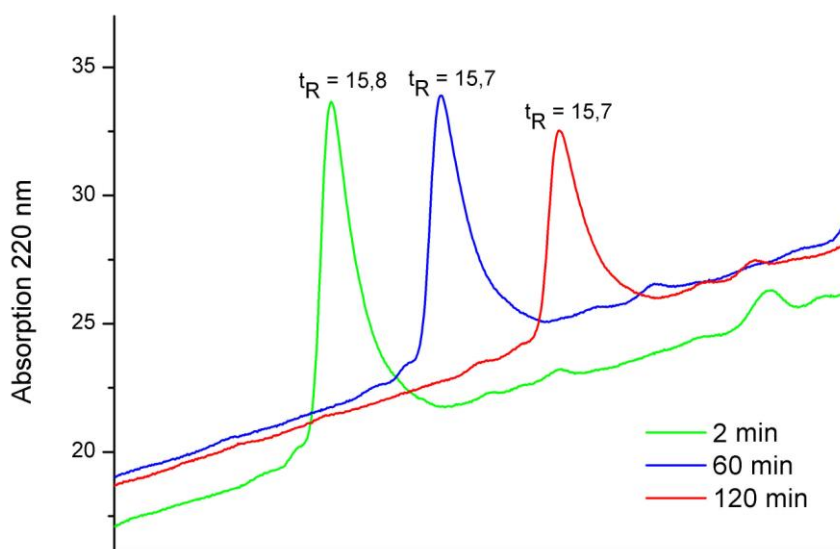


Abb. 26: Stabilität des zyklischen Phospho-Tyrosin **Oktapeptides OP 17** gegenüber Proteinase K, HPLC-System II, Gradient 1

### 7.5.1.3 Abbau des Phospho-Tyrosin Oktapeptides mit Rückgratzyklisierung OP 14

Die Stabilität des Phospho-Tyrosin Oktapeptides mit Rückgratzyklisierung **OP 14** wurde sowohl gegen Chymotrypsin und Proteinase K als auch gegen das Homogenat untersucht.

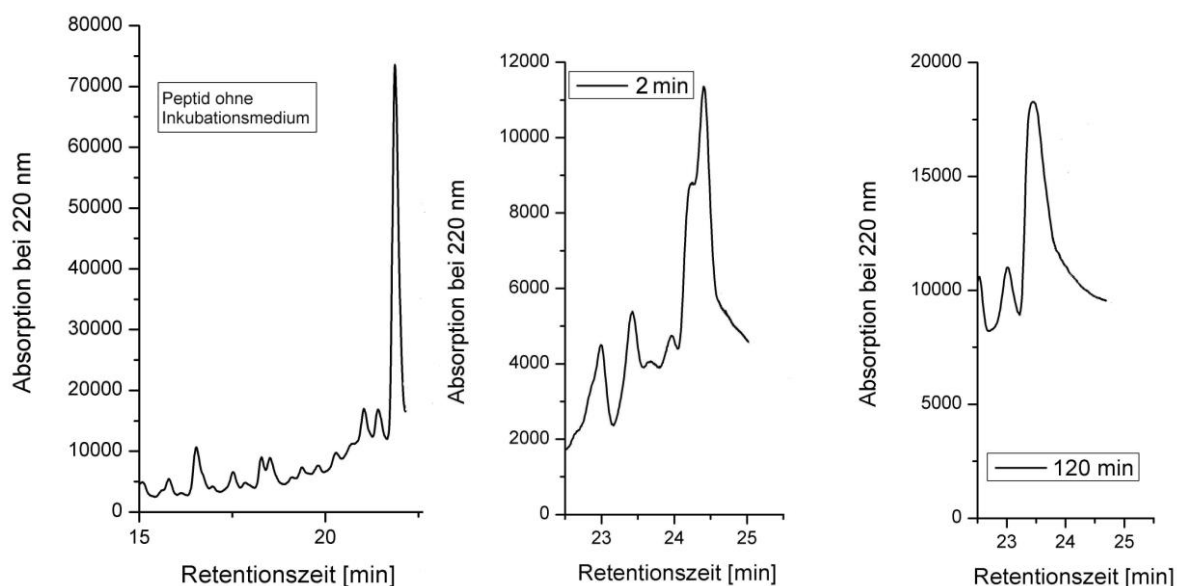


Abb. 27: Stabilität des Phospho-Tyrosin Oktapeptides mit Rückgratzyklisierung **OP 14** gegenüber Proteinase K; HPLC-System II, Gradient 3, linkes Bild ohne Inkubationsmedium

Dieses Oktapeptid ist gegenüber beiden Proteasen und auch dem Homogenat völlig stabil. Selbst nach 120 Minuten ist das Elutionsdiagramm in Gegenwart von Proteinase K noch unverändert (Abb. 27). Es treten keinerlei Spaltprodukte auf. Damit erfüllt dieses Oktapeptid als Vertreter weiterer Oktapeptide mit Rückgratzyklisierung die Erwartungen hinsichtlich der Abbaustabilität, die in die Rückgratzyklisierung gesetzt worden waren.

### 7.5.2 Stabilität gegenüber Phosphatasen

Bei einer *in vivo* Anwendung muss auch die Phosphatase-Aktivität der Zellen, der Gewebe oder der Körperflüssigkeiten in Betracht gezogen werden. Konkret ging es bei unseren Versuchen um die Phosphatase-Aktivität der für den funktionellen Zell-Test eingesetzten NIH 3T3-Zellen. Um sowohl sezernierte und membranständige als auch intrazelluläre Phosphatasen zu erfassen, wurde ein Homogenat dieser Zellen eingesetzt. Da in diesem Homogenat sowohl Phosphatase als auch Protease-Aktivität vorhanden sind, wurden alle Peptide sowohl mit reinem Homogenat als auch mit Homogenat und dem Phosphatase-Inhibitor  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  inkubiert. Die dabei angewandte Inhibitorkonzentration sollte die Phosphatase-Aktivität völlig ausschalten und so durch Vergleich der Elutionsdiagramme mit und ohne Vanadat Rückschlüsse auf die Abspaltung des Phosphatrestes vom Tyrosin zulassen. Obwohl die chemische Analytik der reinen Oktapeptide zeigt, dass die unphosphorylierten Oktapeptide eine um ca. 3 Minuten höhere Retentionszeit als die phosphorylierten besitzen, trifft das aber nicht auf die HPLC-Analysen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen zu. Deshalb ist die Dephosphorylierung neben dem proteolytischen Abbau nicht so eindeutig detektierbar, wie erwartet worden war.

Ähnlich wie bei dem linearen Oktapeptid **OP 8** erfolgte die Untersuchung des Abbaues in zwei unterschiedlichen HPLC-Systemen. Da das lineare Oktapeptid durch das Zellhomogenat nicht proteolytisch abgebaut wurde, erfolgte erwartungsgemäß auch keinerlei Spaltung der zyklischen Oktapeptide **OP 14** und **OP 17**. Da weder bei dem linearen Peptid noch bei den zyklischen Oktapeptiden Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne Zusatz von  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  festgestellt werden können, ist wahrscheinlich auch eine störende Phosphatase-Aktivität der NIH 3T3-Zellen auszuschließen.

### 7.6 Biologische Aktivität der linearen Oktapeptide OP 3 bis OP 6 mit Ser( $\beta$ Ph)

Diese linearen Peptide sind durch die nichtproteinogene Aminosäure Ser( $\beta$ Ph) etwas gegen proteolytischen Abbau geschützt. Ihre Aktivität wurde von D. Imhof [186] sowohl an der Stimulierung der SHP-1 als auch an der Affinität zu deren N-terminaler SH2-Domäne

bestimmt. Verglichen mit anderen linearen und über die Seitenketten zyklisierten Peptiden besitzen sie eine mittlere bis gute Aktivität im mikromolaren Bereich. Sie werden hier nicht weiter diskutiert, weil der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Rückgratzyklisierung liegt.

## **7.7 Biologische Aktivität der linearen und zyklischen Oktapeptide OP 10 bis OP 17**

### **7.7.1 Stimulierung der Aktivität der SHP-1**

Die Stimulierung der Aktivität wurde an einer rekombinanten SHP-1 des Menschen untersucht. Diese enthielt keinen zur Reinigung benötigten GST-Tag mehr. Der Vergleich mit dem GST-getagten Enzym lässt jedoch keine prinzipiellen Unterschiede in der Stimulierbarkeit erkennen. Die Aktivität der SHP-1 wurde mittels eines Phosphatase-Tests mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat bestimmt. In Tabelle 16 sind die mittlere Basalaktivität der SHP-1 und die stimulierten Aktivitäten sowie die Quotienten aus der jeweiligen stimulierten Aktivität und der Basalaktivität zusammen gestellt. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass alle untersuchten Peptide die Basalaktivität erhöhen. Die Oktapeptid-Liganden wurden in Konzentrationen von 50, 100 und 500  $\mu\text{M}$  zur Stimulation eingesetzt. Die Aktivität der SHP-1 nimmt dabei nicht in allen Fällen konzentrationsabhängig zu. Die hohen Konzentrationen an Oktapeptid-Liganden können dabei wahrscheinlich auch als kompetitive Inhibitoren der Phosphatase-Aktivität wirken. Diese Vermutung muss jedoch noch durch die direkte Beeinflussung der katalytischen Domäne der SHP-1 bewiesen werden.



Tab. 16: Stimulierung der Aktivität der SHP-1 durch Oktapeptid-Liganden

Peptid.	Struktur	Aktivität nmol Pi min	Quotient Aktivität Basalwert
	Basalaktivität der SHP-1	28	
<b>OP 7</b>	H-Gly-Glu-Leu-Asn- <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	260	9,3
<b>OP 8</b>	H-Gly-Glu-Leu-Abu- <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	210	7,5
<b>OP 9</b>	H-Glu-Gly-Leu-Abu-Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub>	125	4,5
<b>OP 10</b>	H-Glu-Gly-Leu-AsnΨ[CO-N] <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub> <div style="text-align: center;"> <math>\downarrow</math>  <math>(CH_2)_3-NH \leftarrow Gly</math> </div>	140	5,0
<b>OP 11</b>	H-Glu-Gly-Leu-AbuΨ[CO-N] <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub> <div style="text-align: center;"> <math>\downarrow</math>  <math>(CH_2)_3-NH \leftarrow Gly</math> </div>	45	1,6
<b>OP 13</b>	H-Glu-Gly-Leu-AbuΨ[CO-N] <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub> <div style="text-align: center;"> <math>\downarrow</math>  <math>(CH_2)_4-NH \leftarrow Gly</math> </div>	105	3,8
<b>OP 14</b>	H-Glu-Gly-Leu-AbuΨ[CO-N] <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub> <div style="text-align: center;"> <math>\downarrow</math>  <math>(CH_2)_5-NH \leftarrow Gly</math> </div>	160	5,7
<b>OP 16</b>	H-Glu-Gly-Leu-AbuΨ[CO-N] <b>p</b> Tyr-Nle-Asp-Leu-NH <sub>2</sub> <div style="text-align: center;"> <math>\downarrow</math>                      <math>\downarrow</math>  <math>CH_2-C_6H_{10}-CH_2-NH</math> </div>	390	13,9
<b>OP 17</b>	H-Glu-Gly-Glu-AbuΨ[CH <sub>2</sub> -NH] <b>p</b> Tyr-Nle-Lys-Leu-NH <sub>2</sub> <div style="text-align: center;"> <math>\downarrow</math>                      <math>\downarrow</math>  <math>\text{-----}</math> </div>	420	15,0

Pi: anorganisches Phosphat

Die in der Tabelle aufgelisteten Werte lassen Struktur-Wirkungs-Betrachtungen zu. Asn in Position pY-1 ergibt sowohl bei dem linearen Peptid **OP 7** als auch bei dem zyklischen Peptid **OP 10** eine höhere Aktivität als Abu. Trotzdem hat sich der zur Vereinfachung der Synthesen vorgenommene Austausch von Asn gegen Abu bewährt. Die Peptide mit Abu sind in gut abgestufter Weise aktiv. Auch das nichtphosphorylierte Peptid **OP 9** stimuliert die SHP-1, aber in Übereinstimmung mit der Literaturmeinung nur zur Hälfte. Bei den Peptiden mit Rückgratzyklisierung **OP 11**, **OP 13**, **OP 14** nimmt die Wirksamkeit mit der Länge der aliphatischen Ketten in der Laktambrücke in der Reihenfolge  $(CH_2)_3 < (CH_2)_4 < (CH_2)_5$  zu. Dieser Effekt kann auf eine Zunahme der Beweglichkeit der Kette und auf hydrophobe Wechselwirkungen mit der SH2-Domäne zurückgeführt werden. Das aktivste rückgratzyklisierte Peptid **OP 16** enthält einen zykoaliphatischen Rest mit trans-Konfiguration am Zylohexyl-Ring in der Laktambrücke, der die Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkungen unterstreicht. Verglichen mit dem linearen Peptid gleicher Sequenz zeigt die höhere Aktivität dieses Peptides, dass durch Rückgratzyklisierung die aktive Konformation stabilisiert werden kann. Dieses Peptid stützt die angenommene modellierte

bioaktive Grundstruktur. Für die Entwicklung von Peptidwirkstoffen zur Signaltransduktionstherapie kann der Schluss gezogen werden, dass zur Vereinfachung der Synthese auch zyklische Liganden mit unphosphoryliertem Tyrosin eingesetzt werden könnten.

Das Oktapeptid **OP 17** mit einer reduzierten Peptidbindung zwischen Abu und Phosphotyrosin sowie Seitenkettenzyklisierung weist innerhalb dieser Reihe die stärkste Wirksamkeit auf. Die reduzierte Peptidbindung erhöht die Flexibilität des Rückgrates, was für das Andocken an die SH2-Domäne wesentlich zu sein scheint.

Da sowohl die Oktapeptide mit Rückgratzyklisierung als auch das Oktapeptid mit reduzierter Peptidbindung stabil gegen den proteolytischen Abbau sind und darüber hinaus eine ausreichende biologische Wirksamkeit aufweisen, könnten aus ihnen Leitstrukturen für die Entwicklung von Peptidwirkstoffen zur Signaltransduktionstherapie abgeleitet werden.

#### **7.7.2 Funktionelle Charakterisierung der Internalisierung von linearen und zyklischen Oktapeptiden in HeLa-Zellen (Klusterbildungs-Test)**

In diesem Test soll der Einsatz ausgewählter Oktapeptidliganden zur Beeinflussung intrazellulärer Prozesse untersucht werden. Konkret geht es um die Beeinflussung der intrazellulären Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 durch internalisierte Phosphopeptid-Liganden für deren N-terminale SH2-Domäne. Für den Eintransport in die NIH 3T3-Zellen wird mit einem Cocktail aus Zell-penetrierenden Peptiden (JBS-Proteoducin) ein nicht-kovalenter Komplex gebildet. Die Aktivierung der SHP-1 durch Phosphopeptid-Liganden für ihre SH2-Domäne sollte dabei eine Clusterbildung der Zellen verhindern, eine Hemmung der SHP-1 die Clusterbildung begünstigen.

Die verwendeten Zellen besitzen permanent exprimiert ein chimäres Fusionsprotein, das extrazellulär aus dem membranständigen Teil des NGF-Rezeptors und intrazellulär aus der Ros-Kinase-Domäne besteht. Die Stimulierung dieser Chimäre durch NGF $\beta$  führt zur Phosphorylierung der intrazellulären Ros-Kinase-Domäne. Über eine nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade erfolgt die Bildung von Zellklustern. Die SHP-1 als Phospho-Tyrosin-Phosphatase kann Tyrosin-Reste der Ros-Kinase-Domäne wieder dephosphorylieren und damit die zur Clusterbildung führende Kaskade abschalten. Die Expression der SHP-1 kann durch anhydro Tetrazyklin (ATC) unterdrückt werden. Zur vollständigen Repression werden 100 ng ATC zugegeben, mit 3 ng ATC wird noch eine geringe Menge SHP-1 exprimiert. Deren Aktivität kann durch Liganden für die N-terminale SH2-Domäne erhöht (aktivierende Liganden) oder erniedrigt (inaktivierende Liganden) werden.

Bei den folgenden Bildern handelt es sich um erste Ergebnisse, die durch weitere Untersuchungen und mehrfache Wiederholungen abgesichert werden müssen. Aus den Bildern ist zu ersehen, dass analog zu KEILHACK et al. [188] bei vollständig unterdrückter Bildung (100 ng ATC) von SHP-1 (A, B) eine Klusterbildung durch Stimulierung mit NGFβ erreicht werden kann (B). Bild C zeigt nur eine sehr geringe Klusterbildung. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass mit 3 ng ATC noch eine solche Menge an SHP-1 gebildet wird, die ausreicht trotz Stimulierung mit NGFβ die Ros-Kinase-Domäne wieder weitgehend zu dephosphorylieren.

Die Bilder D und F zeigen eine ausgeprägte Klusterbildung. Sie kann auf eine Hemmung der SHP-1 zurückgeführt werden. Das heißt, dass die Peptide **OP 8** und **OP 17** hier als inaktivierende Liganden wirken. Da Bild E mit A und C weitgehend übereinstimmt kann für Peptid **OP 14** angenommen werden, dass es kein inaktivierender Ligand ist. Eine Aktivierung der SHP-1 kann aber bei dieser Versuchsanordnung schlecht festgestellt werden. Bild E belegt gleichzeitig, dass das zur Internalisierung der Phosphopeptide eingesetzte JBS-Proteoducin keine Eigenwirkung in diesem Test besitzt, während die Bilder D und F den Eintransport einer genügend großen Menge an phosphoryliertem Oktapeptid erkennen lassen. Ob der gefundene Effekt auf eine Beeinflussung der Phosphatase-Aktivität, z. B. auf eine Hemmung der katalytischen Domäne, zurückgeführt werden kann, ist mit dieser Versuchsanordnung nicht erkennbar. es ist auch möglich, dass die Oktapeptide an einer anderen Stelle in die Signalkette eingreifen.

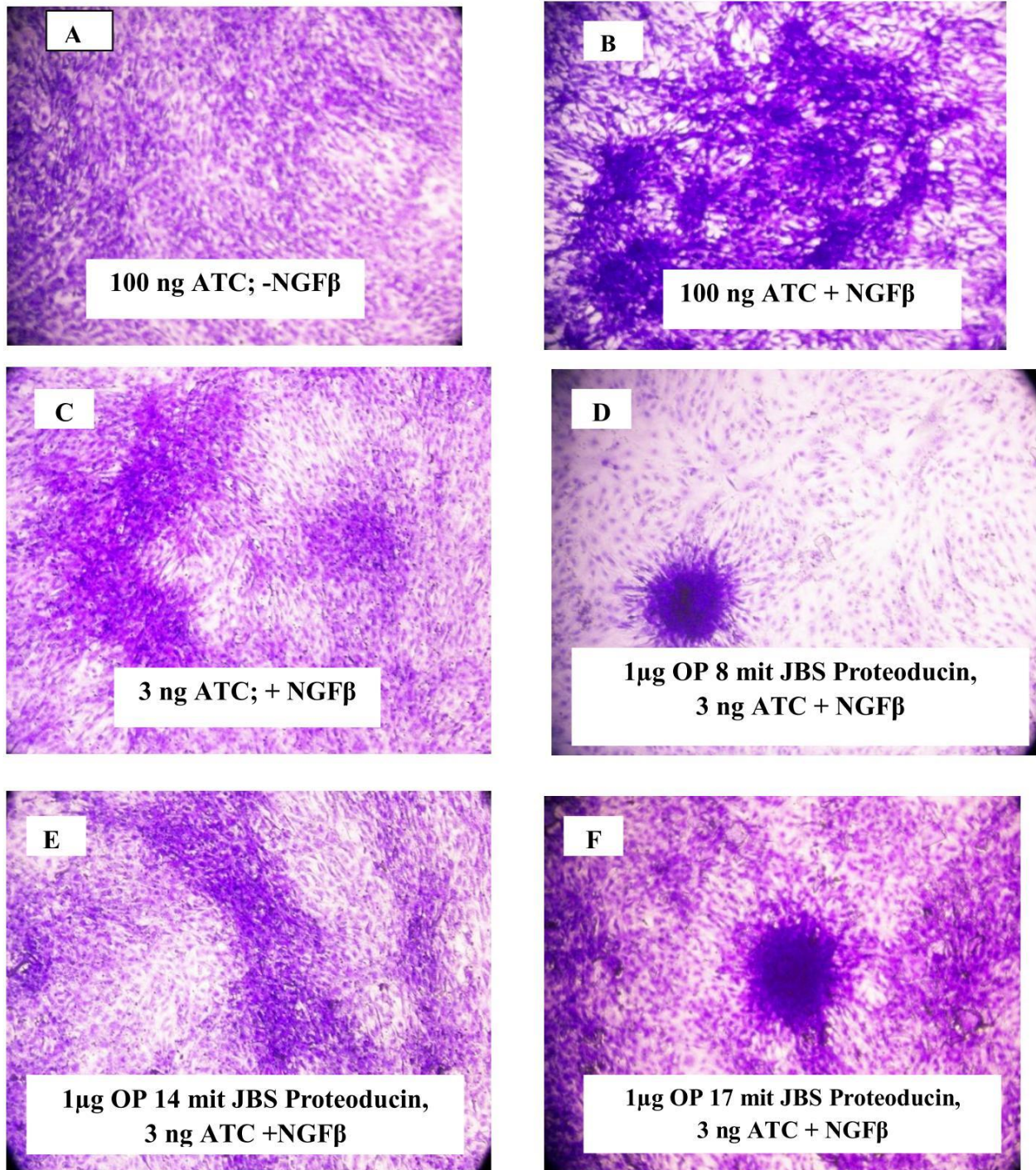


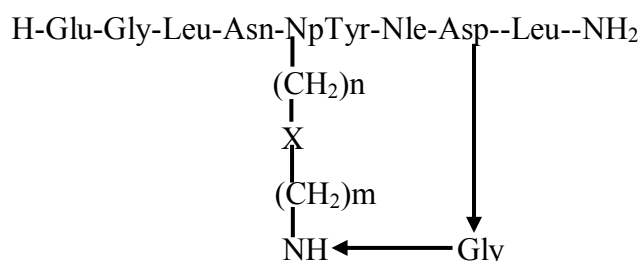
Abb. 28: Clusterbildung bei NIH 3T3\_Zellen. Alle Versuche wurden mit  $5 \times 10^6$  Zellen/ml begonnen. (A): Die NIH 3T3-Zellen wurden in Anwesenheit von 100 ng/ml ATC und in Abwesenheit von NGFβ für 14 Tage inkubiert. (B): Die Zellen wurden in Anwesenheit von 100 ng/ml ATC und 50 ng/ml NGFβ für 14 Tage inkubiert. (C): Diese Zellen wurden in Anwesenheit von 3 ng/ml ATC und 50 ng/ml NGFβ inkubiert. (D, E, F): Zellen 5 Tage mit 100 ng/ml ATC, danach mit 3 ng/ml ATC, 50 ng/ml NGFβ und Komplex aus dem jeweiligen Peptid mit JBS-Proteoducin inkubiert.

## 8 Zusammenfassung

Die Synthese von Oktapeptid-Liganden mit Rückgratzyklisierung am Phosphotyrosin stellt eine große Herausforderung dar. Nachdem es in Vorversuchen nicht gelungen war, N-funktionalisierte Derivate bzw. Pseudodipeptide des phosphorylierten Tyrosins darzustellen, mussten die Synthesen mit ungeschützter phenolischer Hydroxyl-Gruppe durchgeführt werden. Das führte erwartungsgemäß zu einer Reihe von Nebenreaktionen. Die sehr niedrigen Kopplungsraten bei der Ankondensation an das N-funktionalisierte Tyrosin beweisen die Notwendigkeit, vorgeformte Dipeptid-Bausteine mit Tyrosin herzustellen.

Es gelang, eine Serie von Pseudo-Dipeptiden mit N-Aminoalkyl-Tyrosin **Fmoc-ASΨ[CO-N(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-Alloc]Tyr** in guter Ausbeute und durch Flash-Chromatographie in der erforderlichen Reinheit herzustellen. Da das Pseudodipeptid mit geschütztem Asparagin nur durch Mehrfachkopplungen an dem säurelabilen SASRIN-Harz aufgebaut werden konnte, wurde die Aminosäure Asn in dieser Position durch die isostere Aminosäure α-Amino-Buttersäure (Abu) ersetzt, die keinen Seitenkettenschutz erfordert. Die Versuche zur Synthese von Dipeptiden mit N-Carboxyalkyl-Tyrosin **Fmoc-ASΨ[CO-N(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOAll]Tyr** bzw. mit acylierter reduzierter Peptidbindung **Fmoc-ASΨ[CH<sub>2</sub>-N(CO-R)]Tyr** verliefen dagegen trotz Nutzung der Mikrowelle und großer Überschüsse an Acylierungsreagenz erfolglos.

Der Aufbau der Oktapeptid-Liganden am RINK-Amid-Harz bereitete durch die ungeschützte phenolische Hydroxylgruppe des Tyrosins erwartungsgemäß einige Schwierigkeiten. So erfolgte in einigen Fällen eine zu geringe Ankondensation und die freie Hydroxylgruppe wurde vorübergehend acyliert. Während die Zyklisierungsreaktion problemlos verlief, musste die Phosphorylierung des Tyrosins im Oktapeptid wiederholt werden und führte zu uneinheitlichen Produkten. Nach deren Reinigung durch semipräparative HPLC konnten 6 phosphorylierte und zwischen Seitenkette und Rückgrat zyklisierte Oktapeptide gewonnen und charakterisiert werden.



Diese zyklischen Peptide sind im Gegensatz zu den linearen stabil gegen den Abbau durch Proteasen (Chymotrypsin, Proteinase K). Damit erfüllen sie eine Voraussetzung für die Erprobung ihrer Wirksamkeit in lebenden Zellen und als mögliche Leitstrukturen für einen Einsatz in der Signaltransduktionstherapie.

Alle linearen und zyklischen Oktapeptid-Liganden erhöhen die Grundaktivität der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1. Dabei ergaben sich folgende Struktur-Wirkungs-Beziehungen: Asn in Position pY-1 ergibt sowohl bei dem linearen als auch bei einem Peptid mit Rückgratzyklisierung eine geringfügig höhere Stimulierung als Abu. Das zeigt, dass der Ersatz von Asn durch Abu möglich war und zu biologisch aktiven Verbindungen führt. Auch das lineare Peptid ohne Phosphat-Rest stimuliert die SHP-1, aber nur zur Hälfte, was mit den Literaturdaten über den Beitrag des Phosphatrestes zur Affinität zur SH2-Domäne der SHP-1 gut übereinstimmt. Bei den Peptiden mit aliphatischen Resten in der Laktam-Brücke nimmt die stimulatorische Aktivität in der Reihenfolge  $(CH_2)_3 < (CH_2)_4 < (CH_2)_5$ , d.h. mit der Kettenlänge, zu. Das aktivste Peptid mit Seitenketten-Rückgratzyklisierung enthält einen zykoaliphatischen Rest in der Brücke. Daraus und aus der Rangfolge der aliphatischen Reste kann angenommen werden, dass die Brücke hydrophobe Wechselwirkungen mit der SH2-Domäne ausbildet. Peptide mit Rückgratzyklisierung, die die SHP-1 stärker stimulieren als lineare Peptide mit gleicher Sequenz, stützen das zugrunde liegende Modell. In ersten Versuchen zur Internalisierung und funktionellen Charakterisierung ausgewählter Liganden in lebende Zellen konnte gezeigt werden, dass die Peptide eine intrazelluläre Reaktion hervorrufen, die jedoch nicht mit den gefundenen Aktivierungswerten für die SHP-1 übereinstimmt.

Die biologische Aktivität, die Stabilität gegen den proteolytischen Abbau und die Möglichkeit der Internalisierung zeigen, dass es mit Hilfe der Methode der Rückgratzyklisierung möglich sein sollte, Peptide zu potentiellen Pharmaka in der Signaltransduktionstherapie entwickeln zu können.



## 9 Literaturverzeichnis:

1. Sathish, J. G., Matthews, R. J. (2003) SHP-1 twelve years on: structure, ligands, substrates and biological roles. *Topics in Current Genetics*, **5**, 301-331.
2. Zhang, J. Somani, A. K. and Siminovitch, K. A. (2000) Roles of SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of Cell signalling. *Immunology*, **12**, 361-378.
3. Sweeney, M. C., Wavreille, A. S., Park, J., Butchar, J. P., Tridandapani, S. and Pei, D. (2005) Decoding Protein-Protein Interactions through Combinatorial Chemistry: Sequence Specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIP SH2 Domains. *Biochemistry*, **44**, 14932-14947.
4. Frank, C., Burkhardt, C., Imhof, D., Ringel, J., Zschörnig, O., Wieligmann, K., Zacharias, M., and Böhmer, F. (2004) Effective Dephosphorylation of Src Substrates by SHP-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 11375-11383.
5. Schumann, C., Seyfarth, L., Greiner, G., Paegelow, I. and Reissmann, S. (2002) Synthesis and biological activities of new side chain and backbone cyclic bradykinin analogues. *J. Peptide Res.*, **60**, 128-140.
6. Reissmann, S. and Imhof, D. (2004) Development of Conformationally Restricted Analogues of Bradykinin and Somatostatin Using Constrained Amino Acids and Different Types of Cyclization. *Current Medicinal Chemistry*, **11**, 2823-2844.
7. Besser, D., Olender, R., Rosenfeld, R., Arad, O. and Reissmann, S. (2000) Study on cyclization tendency of backbone cyclic tetrapeptides. *J. Peptide Res.*, **56**, 337-345.
8. Cohen, P. (2000) The regulation of protein functions by multisite phosphorylation-a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 596-601.
9. Vetter, S. V. and Zhang, Z. (2002) Probing the Phosphopeptide Specificities of Protein Tyrosine Phosphatases, SH2 and PTB Domains with Combinatorial Library Methods. *Current Protein and Peptide Science*, **3**, 365-397.
10. Hanks, S. K. und Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.*, **9**, 576-596.
11. Baily, L. und Waldmann, H. (2005) Inhibitoren der Proteintyrosinphosphatasen: Kandidaten für zukünftige Wirkstoffe? *Angew. Chem.*, **117**, 3880-3906.
12. Li, L. and Dixon, J. E. (2000) Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases. *Semin Immunol.*, **12**, 75-84.
13. Andersen, J. N., Mortensen, O. H., Peters, G. H., Drake, P. G., Iversen, L. F., Olsen, O. H., Jansen P. G., Andersen, H. S., Tonks, N. T., Moller, N. P. H. (2001) Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 7117-7136.
14. Fang, K. S., Barker, K., Sudol, M. and Hanafusa, H. (1994) A transmembrane proteintyrosinephosphatase contains spectrin-like repeats in its extracellular domain. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14056-14063.
15. Trowbridge, I. S. and Thomas, M. L., (1994) CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 85-116.

16. Yanagi, S., Sugawara, H., Kurosaki, M., Sabe, H., Yamamura, H. and Kurosaki, T. (1996) CD45 modulates phosphorylation of both autophosphorylation and negative regulatory tyrosines of Lyn in B cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 30487-30492.
17. Williams, A. F., and Barclay, A. N. (1988) The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, **6**, 381-405.
18. Cunningham, B. A. (1995) Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 628-633.
19. Streuli, M., Krueger, N. X., Ariniello, P. D., Tang, M., Munro, J. M., Blattler, W. A., Adler, D. A., Disteché, C. M., and Saito, H. (1992) Expression of the receptor-linked proteintyrosine phosphatase LAR: proteolytic cleavage and shedding of the CAM-like extracellular region. *EMBO J.*, **11**, 897-907.
20. Yu, Q., Lenardo, T., and Weinberg, R. A. (1992) The N-terminal and C-terminal domains of a receptor tyrosine phosphatase are associated by non-covalent linkage. *Oncogene*, **7**, 1051-1057.
21. Beckmann, G., and Bork, P. (1993) An adhesive domain detected in functionally diverse receptors. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 40-41.
22. Krueger, N. X., Streuli, M., and Saito, H. (1990) Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *EMBO J.*, **9**, 3241-3252.
23. Ostman, A., Yang, Q., and Tonks, N. K. (1994) Expression of DEP-1, a receptor-like proteintyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**, 9680-9684.
24. Matozaki, T., Suzuki, T., Uchida, T., Inazawa, J., Ariyama, T., Matsuda, K., Horita, K., Noguchi, H., Mizuno, H., Sakamoto, C., and Kasuga, M. (1994) Molecular cloning of a human transmembrane-type protein tyrosine phosphatase and its expression in gastrointestinal cancers. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2075-2081.
25. Wiggins, R. C., Wiggins, J. E., Goyal, M., Wharram, B. L., and Thomas, P. E. (1995) Molecular Cloning of cDNAs Encoding Human GLEPP1, a Membrane Protein Tyrosine Phosphatase: Characterization of the GLEPP1 Protein Distribution in Human Kidney and Assignment of the GLEPP1 Gene to Human Chromosome 12p12-p13, *Genomics*, **27**, 174-181.
26. Matthews, R. J., Cahir, E. D., and Thomas, M. L. (1990) Identification of an additional member of the protein-tyrosine-phosphatase family: evidence for alternative splicing in the tyrosine phosphatase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**, 4444-4448.
27. Barnea, G., Silvennoinen, O., Shaanan, B., Honegger, A. M., Canoll, P. D., Deustachio, P., Morse, B., Levy, J. B., Laforgia, S., Huebner, K., Musacchio, J. M., Sap, J. and Sclessinger, J. (1993) Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 1497-1506.
28. Levy, J. B., Canoll, P. D., Silvennoinen, O., Barnea, G., Morse, B., Honegger, A. M., Huang, J. T., Cannizzaro, L. A., Park, S. H., Druck, T., Huebner, H., Sap, J., Ehrlich, M., Musacchio, J. M. and Schlessinger, J. (1993) The Cloning of a Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase expressed in the Central Nervous System. *J. Biol. Chem.*, **268**, 10573-10581.



29. Shitara, K., Yamada, H., Watanabe, K., Shimonaka, M. und Yamaguchi, Y. (1994) Brain-specific receptor-type protein-tyrosine-phosphatase RPTP $\beta$  is a chondroitin sulfate proteoglycan in vivo. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20189-20193.
30. Nguyen, T. H., Paul, S., Xu, Y., Gurd, J. W., and Lombroso, P. J. (1999) Calcium-dependent cleavage of striatal enriched tyrosine phosphatase (STEP), *J. Neurochem.*, **73**, 1995-2001.
31. Sharma, E., and Lombroso, P. J. (1995) A neuronal protein tyrosine phosphatase induced by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.*, **270**, 49-53.
32. Lombroso, P. J., Murdoch, G., and Lerner, M. (1991) Molecular characterization of a protein-tyrosine-phosphatase enriched in striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **88**, 7242-7246.
33. Adachi, M., Sekiya, M., Isobe, M., Kumura, Y., Ogita, Z., Hinoda, Y., Imai, K., and Yachi, A. (1992) Molecular cloning and chromosomal mapping of a human protein-tyrosinephosphatase LC-PTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**, 1607-1615.
34. Lan, M. S., Lu, J., Goto, Y., and Notkins, A. L. (1994) Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA and Cell Biol.*, **13**, 05-14.
35. Brown-Shimer, S., Johnson, K. A., Lawrence, J. B., Johnson, C., Bruskin, A., Green, N. R., and Hill, D. E. (1990) Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**, 5148-5152.
36. Guan, K. and Dixon, J. E. (1990) Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in Yersinia. *Science*, **249**, 553-556.
37. Frangioni, J. V., Beahm, P. H., Shifrin, V., Jost, C. A., and Neel, B. G. (1992) The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell*, **68**, 545-560.
38. Cool, D. E., Tonks, N. K., Charbonneau, H., Fischer, E. H., and Krebs, E. G. (1990). Expression of a human T-cell protein-tyrosine-phosphatase in baby hamster kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**, 7280-7284.
39. Shen, S. H., Bastien, L., Posner, B. I., and Chretien, P. (1991) A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. *Nature*, **352**, 736-739.
40. Yi, T. L., Cleveland, J. L. and Ihle, J. N. (1992) Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 836-846.
41. Freeman, R. M., Plutzky, J., and Neel, B. G. (1992) Identification of a human src homology 2 containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of Drosophila corkscrew. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **89**, 11239-11243.
42. Vogel, W., Lammers, R., Huang, J. and Ullrich, A. (1993) Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science*, **259**, 1611-1614.
43. Gu, M., Warshawsky, I. and Majerus, P. W. (1992) Cloning and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to retinaldehydebinding protein and yeast SEC14p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **89**, 2980-2984.

44. Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis, *Science*, **234**, 364-368.
45. Banville, D., Ahmad, S., Stocco, R., and Shen, S. H. (1994) A novel protein-tyrosine phosphatase with homology to both the cytoskeletal proteins of the band 4.1 family and junction-associated guanylate kinases. *J. Biol. Chem.*, **269**, 22320-22327.
46. Sato, T., Irie, S., Kitada, S. und Reed, J. C. (1995) FAP1: a protein tyrosine phosphatase that associates with FAS. *Science*, **268**, 411-415.
47. Guan, K. und Dixon, J. E. (1991) Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J. Biol. Chem.*, **266**, 17026-17030.
48. Yang, J., Liang, X., Niu, T., Meng, W., Zhao, Z., Zhou, G.W. (1998) Crystal structure of the catalytic domain of protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem.*, **273**, 28199-281207.
49. Streuli, M., Krueger, N. X., Thai, T., Tang, M., Saito, H. (1990) Distinct functional roles of the two intracellular phosphatase like domains of the receptor-linked protein tyrosine phosphatases LCA and LAR. *EMBO J.*, **9**, 2399 – 2407.
50. Stuckey, J. A., Fauman, E. B., Schubert, H. L., Zhang, Z. Y., Dixon, J. E., Saper, M. A. (1994) Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate. *Nature*, **370**, 575–578.
51. Zhang, Y. L., Hollfelder, F., Gordon, S. J., Chen, L., Keng, Y. F. (1999) Impaired Transition State Complementarity in the Hydrolysis of *O*-Arylphosphorothioates by Protein-Tyrosine Phosphatases. *Biochemistry*, **38**, 12111–12123.
52. Zhang, Z. Y., Wang, Y., Dixon, E. J. (1994) Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1624–1627.
53. Denu, J. M., Lohse, D. L., Vijayalakshmi, J., Saper, M. A., Dixon, J. E. (1996) Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2493–2498.
54. Zhang, Z. Y., Palfey, B. A., Wu, L., Zhao, Y. (1995) Catalytic Department of A Function of the Conserved Hydroxyl Group in the Protein Tyrosine Phosphatase Signature Motif. *Biochemistry*, **34**, 16389–16396.
55. Minassian, B. A., Ianzano, L., Meloche, M., Andermann, E., Rouleau, E. A., Delgado-Escueta, A. V., Scherer, S. W. (2000) Mutation spectrum and predicted function of laforin in Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *Neurology*, **55**, 341–346.
56. Takeuchi, T., Pang, M., Amano, K., Koide, J., Abe, T. (1997) Reduced protein tyrosine phosphatase (PTPase) activity of CD45 on peripheral blood lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin. Exp. Immunol.*, **109**, 20–26.
57. Hunter, T. (1989) Protein-tyrosine phosphatases: the other side of the coin. *Cell*, **58**, 1013–1016.
58. Chim, C. S., Wong, K. Y., Loong, F. and Srivastava, G. (2004) SOCS1 and SHP-1 hypermethylation in mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Leukemia*, **18**, 356-358.
59. Shultz, L. D., Schweitzer, P. A., Rajan, T. V., Yi, T., Ihle, J. N., Matthews, R. J., Thomas, M. L. and Beier, D. R. (1993) Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell*, **73**, 1445–1454.

60. Kamata, T., Yamashita, M., Kimura, M., Murata, K., Inami, M., Shimizu, C., Sugaya, K., Wang, C. R., Taniguchi, M. and Nakayama, T. (2003) Src-homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.*, **111**, 109–119.
61. Lazarovits, A. I., Poppema, S., Zhang, Z., Khandaker, M., LeFeuvre, C. E., Singhal, S. K., Garcia, B. M., Ogasa, N., Jevnikar, A. M., White, M. J., Singh, G., Stiller, S. R., Zhong, R. Z. (1996) Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB. *Nature*, **380**, 717–720.
62. Thompson, L. J., Jiang, J., Madamanchi, N., Runge, M. S., Patterson, C. (2001) PTP- $\epsilon$ , a tyrosine phosphatase expressed in endothelium, negatively regulates endothelial cell proliferation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **281**, H396–H403.
63. Cristofano, A. D., Pandolfi, P. P. (2000) The Multiple Roles of PTEN in Tumor Suppression. *Cell*, **100**, 387–390.
64. Ponniah, S., Wang, D. Z., Lim, K. L. (1999) Targeted disruption of the tyrosine phosphatase PTPalpha leads to constitutive downregulation of the kinases Src and Fyn. *Curr. Biol.*, **9**, 535–538.
65. Dixon, D., Moyana, T. and King, M. J. (1998) Elevated expression of the cdc25A protein phosphatase in colon cancer. *Exp. Cell Res.*, **240**, 236–243.
66. Bompard, G., Puech, C., Prebois, C., Vignon, F. and Freiss, F. (2002) Protein-tyrosine Phosphatase PTPL1/FAP-1 Triggers Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 47861–47869.
67. Pettiford, S. M., Herbst R. (2003) The protein tyrosine phosphatase HePTP regulates nuclear translocation of ERK2 and can modulate megakaryocytic differentiation of K562 cells, *Leukemia*, **17**, 366–378.
68. Saha, S., Bardelli, A., Buckhaults, P., Velculescu, V. E., Rago, C. S., Croix, B., Romans, K. E., Choti, M. A., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (2001) A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science*, **294**, 1343–1346.
69. Bjorge, J. D., Pang, A. and Fujita, D. J. (2000) Identification of PTB1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J. Biol. Chem.*, **275**, 41439–41446.
70. Shen, Y., Luche, R., Wei, B., Gordon, M. L., Diltz, C. D., Tonks, N. K. (2001) Activation of the Jnk signaling pathway by a dual-specificity phosphatase, JSP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 13613–13618.
71. Nagano, H., Noguchi, T., Inagaki, K., Yoon, S., Matozaki, T., Itoh, H., Kasuga, M. and Hayashi, Y. (2003) Downregulation of stomach cancer-associated protein tyrosine phosphatase-1(SAP-1) in advanced human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, **22**, 4656–4663.
72. Meng, K., Rodriguez-Pena, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M., and Deuel, T. F. (2000) Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2603–2608.
73. Loh, M. L. S., Vattikuti, S., Schubert, S., Reynolds, N. G., Carlson, E., Lieu, K. H., Cheng, J. W., Lee, C. M., Stokoe, D., Bonifas, J. M., Curtiss, N. P., Gotlib, J.,

- Meschinchi, S., Le Beau, M. M., Emanuel, P. D., Shannon, K. M. (2004) Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis. *Blood*, **103**, 2325–2331.
74. Wu, C., Guan, Q., Wang, Y., Zhao, Z. J. and Zhou, G. W. (2003) SHP-1 suppresses cancer cell growth by promoting degradation of JAK kinases. *J. Cell Biochem.*, **90**, 1026–1037.
75. Tsukamoto, T., Takahashi, T., Ueda, R., Hibi, K., Saito, H. and Takahashi, H. (1992) Molecular Analysis of the Protein Tyrosine Phosphatase  $\gamma$ -Gene in Human Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Res.*, **52**, 3506–3509.
76. Bataille, R., Robillard, N., Deceunynck, C. P. and Amiot, M. (2003) A cellular model for myeloma cell growth and maturation based on an intra-clonal CD45 hierarchy, *Immunol. Rev.*, **194**, 105–111.
77. Igawa, T., Lin, F.-F., Rao, P. and Lin, M.-F. (2003) Suppression of LNCaP Prostate cancer xenograft tumors by a prostate-specific protein tyrosine phosphatase, prostatic acid phosphatase. *The Prostate*, **55**, 247–258.
78. Wang, H., Cheng, Z., Malbon, C. C. (2002) Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer Lett.* **191**, 229–237.
79. Tisi, M. A., Xie, Y., Yeo, T. T., Longo, F. M., (2000) Downregulation of LAR tyrosine phosphatase prevents apoptosis and augments NGF-induced neurite outgrowth, *J. Neurobiol.* **42**, 477–486.
80. McLean, J., Batt, J., Doering, L. C., Rotin, D., Bain, J. R. (2002) Enhanced rate of nerve regeneration and directional errors after sciatic nerve injury in receptor protein tyrosine phosphatase  $\sigma$  knock-out mice. *J. Neurosci.*, **22**, 5481–5491.
81. Tan, J., Town, T., Mori, T., Wu, Y., Saxe, M., Crawford, F. and Mullan, M. (2000) CD45 Opposes  $\beta$ -Amyloid Peptide-Induced Microglial Activation via Inhibition of p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase. *J. Neurosci.*, **20**, 7587–7594.
82. Horvat, A., Schwaiger, F. W., Hager, G., Bröcker, F., Streif, R., Knyazev, P. G., Ullrich, A. and Kreutzberg, G. W. (2001) A Novel Role for Protein Tyrosine Phosphatase SHP1 in Controlling Glial Activation in the Normal and Injured Nervous System. *J. Neurosci.*, **21**, 865–874.
83. Marrero, M. B., Papke, R. L., Bhatti, B. S., Shaw, S. and Bencherif, M. (2004) The Neuroprotective Effect of 2-(3-Pyridyl)-1-azabicyclo[3.2.2] nonane (TC-1698), a Novel  $\{\alpha\}^7$  Ligand, Is Prevented through Angiotensin II Activation of a Tyrosine Phosphatase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 16–27.
84. Chong, Z. Z., Lin, S. H., Kang, J. Q., Maiese, K. (2003) The tyrosine phosphatase SHP-2 modulates MAP kinase p38 and caspase 1 and 3 to foster neuronal survival. *Cell Mol. Neurobiol.*, **23**, 561–578.
85. Devinney, I., Steele-Mortimer, I. and Finlay, B. B. (2000) Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* **8**, 29–33.
86. Pathak, M. K. and Yi, T. (2001) Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J. Immunol.*, **167**, 3391–3397.

87. Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., Hatakeyama, M. (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, **295**, 683–686.
88. Koul, A., Choidas, A., Treder, M., Tyagi, A. K., Drlica, K., Singh, Y., Ullrich, A. (2000) Cloning and Characterization of Secretory Tyrosine Phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, **182**, 5425–5432.
89. Yahiro, K., Wada, A., Nakayama, M., Kimura, T., Ogushi, K., Niidome, T., Aoyagi, H., Yoshino, K., Yonezawa, K., Moss, J. and Hirayama, T. (2003) Protein-tyrosinephosphatase  $\alpha$ , RPTP  $\alpha$ , is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J. Biol. Chem.*, **278**, 19183–19189.
90. Klamann, L. D., Boss, O., Peroni, O. D., Kim, J. K., Martino, J. L., Zabolotny, J. M., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y. B., Sharpe, A. H., Stricker-Krongrad, A., Shulman, G. I., Neel, B. G. and Kahn, B. B. (2000) Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 5479–5489.
91. Zabolotny, J. M., Kim, Y. B., Peroni, O. D., Kim, J. K., Pani, M. A., Boss, O., Klamann, L. D., Kamatkar, S., Shulman, G. I., Kahn, B. B., Neel, B. G. (2001) Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5187–5192.
92. Schmidt, A., Rutledge, S. J., Endo, N., Opas, E. E., Tanaka, H., Wesolowski, G., Leu, C. T., Huang, Z., Ramachandaran, C., Rodan, S. B., Rodan, G. A. (1996) Protein-tyrosine phosphatase activity regulates osteoclast formation and function: inhibition by alendronate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3068–3073.
93. Suhr, S. M., Pamula, S., Baylink, D. J. and Lau, K. H. W. (2001) Antisense oligodeoxynucleotide evidence that a unique osteoclastic protein-tyrosine phosphatase is essential for osteoclastic resorption. *J. Bone. Miner. Res.*, **16**, 1795–1803.
94. Kita, A., Uotani, S., Kuwahara, H., Takahashi, R., Oshima, K., Yamasaki, H., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nagayama, Y., Yamaguchi, Y. and Eguchi, K. (2003) Vanadate enhances leptin-induced activation of JAK/STAT pathway in CHO Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 805-809.
95. Matthews, R. J., Bowne, D. B., Flores, E. and Thomas, M. L. (1992) Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 2396-2405.
96. Wade, J. D., Mathieu, M. N., Macris, M., Tregear, G. W. (2000) Base-induced side reactions in Fmoc-solid phase peptide synthesis: Minimization by use of piperazine as  $N^{\alpha}$ -deprotection reagent, *Letters in Peptide Science*, **7**, 107-112.
97. Frank, C., Burkhardt, C., Imhof, D., Ringel, J., Zschörnig, O., Wieligmann, K., Zacharias, M., Böhmer, F. D. (2004) Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1. *J. Biol. Chem.*, **279**, 11375-11383.
98. Yang, J., Liu, L., He, D., Song, X., Liang, X., Zhao, Z. J., Zhou, G. W. (2003) Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem.*, **278**, 6516-6520.

99. Plutzky, J., Neel, B. G., Rosenberg, R. D. (1992) Isolation of a src homology 2-containing tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 1123-1127.
100. Massa, P. T., Saha, S., Wu, C., Jarosinski, K. W. (2000) Expression and function of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in oligodendrocytes. *Glia*, **29**, 376-385.
101. Martin, A., Tsui, H. W., Tsui, F. W. L. (1999) SHP-1 variant proteins are absent in motheaten mice despite presence of splice variant transcripts with open reading frames. *Mol. Immunol.*, **36**, 1029-1041.
102. Tsui, H. W., Haselblatt, K., Martin, A., Mok, S. C.-H., Tsui, F. W. L. (2002) Molecular mechanisms underlying SHP-1 gene expression. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 3057-3064.
103. Banville, D., Stocco, R., Shen, S.-H. (1995) Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts. *Genomics*, **27**, 165-173.
104. Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon S., Eck, M. J., Shoelson, S. E. (1998) Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell*, **92**, 441-450.
105. Yang, J., Chen, Z., Niu, T., Liang, X., Zhao, Z. J., Zhou, G. W. (2000) Structural basis for substrate specificity of protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem.*, **275**, 4066-4071.
106. Alberola-Ila, J., Takaki, S., Kerner, J. D., Perlmutter, R. M. (1997) Differential signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, 125-154.
107. Healy, J. I., Goodnow, C. C., (1988) Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 645-670.
108. Quin, D., Weiss, A. (1997) T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.*, **9**, 205-212.
109. Chan, A. G., Shaw, A. S, (1996) Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosin kinases, *Curr. Opinion Immunol.*, **8**, 394-401.
110. Lorenz, U. (2009), SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels, *Immunological Rev.*, **289**, 342-359.
111. Dustin, L. B., Plas, D. R., Wong, J., Hu, Y. H. T., Soto, C., Chan, A. C., Thomas, M. L, (1999) Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation, *J. Immunol.*, **162**, 2717-2124.
112. Schamel, W. W. A. and Reth, M. (2000) Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity*, **13**, 5-14.
113. Zikherman, J., Weiss, A. (2009) Antigen receptor signaling in the rheumatic diseases, *Arthritis Research and Therapy*, **11**, 202-221.
114. Christensen, M. D., Geisler, C. (2000) Recruitment of SHP-1 Protein Tyrosine Phosphatase and Signalling by a Chimeric T-Cell Receptor-Killer Inhibitory Receptor *Scand. J. Immunol.* **51**, 557-564.
115. Pani G., Fischer, K. D., Mlinaric-Rascan. I., Siminovitch K. A. (1996) Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase. *J. Exp. Med.*, **184**, 839-852.
116. Carter, J. D., Neel, B. G., Lorenz, U. (1999) The tyrosine Phosphatase SHP-1 influences thymocyte selection by setting TCR signaling thresholds. *International Immunology*, **11**, 1999-2013.

117. Lorenz, U., Ravichandran, K. S., Burakoff, S. J., Neel, B. G. (1996) Lack of SHPTP1 results in src-family kinase hyperactivation and thymocyte hyperresponsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9624-9629.
118. Fawcett, V. C. J., Lorenz, U. (2005) Localization of src homology 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) to lipid rafts in T lymphocytes: functional implications and a role for the SHP-1 carboxyl terminus. *J. Immunol.*, **174**, 2849-2859.
119. Sankarshanan, M., Ma, Z., Iype, T., Lorenz, U. (2007) Identification of a novel lipid raft-targeting motif in SRC homology 2-containing phosphatase 1. *J. Immunol.*, **179**, 483-490.
120. Daeron, M., Jaeger, S. Du., Pasquier, L., Vivier, E. (2008) Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol. Rev.*, **224**, 11-43.
121. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H., Riley, J. L., (2004) SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J. Immunol.*, **173**, 945-954.
122. Imhof, D., Wavreille, A. S., May, A., Zacharias, M., Tridandapani, S., Pei, D. (2006) Sequence specificity of SHP-1 and SHP-2 Src homology 2 domains. Critical roles of residues beyond the pY+3 Position. *J. Biol. Chem.*, **281**, 20271-20282.
123. Feng, G. S., Hui, C. C. and Pawson, T. (1993) SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science*, **259**, 1607-1611.
124. Chen, H. E., Chang, S., Trub, T., Neel, B. G. (1996) Regulation of colony-stimulating factor 1 receptor signaling by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 3685-3697.
125. Yi, T., Ihle, J. N. (1993) Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 3350-3358.
126. Migone, T. S., Cacalano, N. A., Taylor, N., Yi, T., Waldmann, T. A., and Johnston, J. A. (1998) Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor; loss of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus type I-transformed T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 3845-3850.
127. Marengère, L. E., Waterhouse, P., Duncan, G. S., Mittrücker, H. W., Feng, G.- S., Mak, T. W. (1996) Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science*, **272**, 1170-1173.
128. Keilhack, H., Müller, M., Böhmer, S.-A., Frank, C., Weidner, K. M., Birchmeier, W., Ligensa, T., Berndt, A., Kosmehl, H., Günther, B., Müller, T., Birchmeier, C., Böhmer, F. D. (2001) Negative regulation of Ros receptor tyrosine kinase signaling. An epithelial function of the SH2 domain protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Cell Biol.*, **152**, 325-334.
129. Keilhack, H., Hellman, U. V., Hengel, J. V., Roy, F., Godovac-Zimmermann, J. and Böhmer, F. D., (2000) The Protein-tyrosine Phosphatase SHP-1 binds to and dephosphorylates p120 Catenin. *J. Biol. Chem.*, **275**, 26376-26384.
130. Nandan, D., Yi, T., Lopez, M., Lai, C. and Reiner, N. E. (2002) Leishmania EF-1 $\alpha$  Activates the Src Homology 2 Domain Containing Tyrosine Phosphatase SHP-1 Leading to Macrophage Deactivation. *J. Biol. Chem.*, **50**, 50190-50197.

131. Olivier, M., Gregory, D. J. and Forget, G. (2005) Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clinical Microbiology Rev.*, **18**, 293–305.
132. Nadan, D., Reiner, N. E. (2005) Leishmania donovani engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Clinical Immunology* **114**, 266–277.
133. Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M. C., Biassoni, R., Moretta, L. (2002) What is a natural killer cell? *Nat. Immunol.*, **3**, 6-8.
134. Leibson, P. J. (1997) Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity*, **6**, 655–661.
135. Brumbaugh, K. M., Binstadt, B. A., Billadeau, D. D., Schoon, R. A., Dick, C. J., Ten, R. M., Leibson, P. J. (1997) Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.*, **186**, 1965–1974.
136. Long, E. O. (1999) Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Ann. Rev. Immunol.*, **17**, 875–904.
137. Liu, B. A., Jablonowski, K., Raina, M., Arce, M., Pawson, T. and Nash, P. D. (2006) The Human and Mouse Complement of SH2 Domain Proteins-Establishing the Boundaries of Phosphotyrosine Signaling. *Molecular Cell*, **22**, 851–868.
138. Bradshaw, J. M., Grucza, R. A., Ladbury, J. E., Waksman, G. (1998) Probing the "two-pronged plug two-holed socket" Model for the mechanism of binding of the Src SH2 domain to phosphotyrosyl peptides: a thermodynamic study. *Biochemistry*, **37**, 9083–9090.
139. Kuriyan, J., Cowburn, D. (1993) Structures of SH2 and SH3 domains. *Curr. Biol.*, **3**, 828–837.
140. Waksman, G., Shoelson, S. E., Pant, N., Cowburn, D., Kuriyan, J. (1993) Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell*, **72**, 779–790.
141. Bradshaw, J. M., Mitaxov, V. and Waksman, G. (1999) Investigation of phosphotyrosine recognition by the SH2 domain of the Src kinase. *J. Mol. Biol.*, **293**, 971–985.
142. Eck, M. J., Shoelson, S. E. and Harrison, S. C. (1993) Recognition of a high-affinity phosphotyrosyl peptide by the Src homology-2 domain of p56lck. *Nature*, **362**, 87–91.
143. Campbell, S. J. and Jackson, R. M. (2003) Diversity in the SH2 domain family phosphotyrosyl peptide binding site. *Protein Engineering*, **16**, 217–227.
144. Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., and Yi, T. (1994) Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2777–2785
145. Huang, H., Li, L., Wu, C., Schibli, D., Colwill, K., Ma, S., Li, C., Roy, P., Ho, K., Songyang, Z., Pawson, T., Gao, Y. and Li, S. S. C. (2008) Defining the Specificity Space of the Human Src Homology 2 Domain. *Molecular and Cellular Proteomics*, **7**, 768–784.
146. Mao, X., Ren, Z., Parker, G. N., Sonderrmann, H., Pastorello, M. A., Wang, W., McMurray, J. S., Demeler, B., Darnell, J. J. E., and Chen, X. (2005) Structural bases of unphosphorylated STAT-1 association and receptor binding. *Mol. Cell*, **17**, 761–771.
147. Beebe, K. D., Wang, P., Arabaci, G., Pei, D. (2000) Determination of the binding specificity of the SH2 domains of protein tyrosine phosphatase SHP-1 through the



- screening of a combinatorial phosphotyrosyl peptide library. *Biochemistry*, **39**, 13251-13260.
148. Carpino, L. A., Han, G. Y., (1972) The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group". *J. Org. Chem.*, **37**, 3404-3409.
149. Kunz, H. and Unverzagt, C. (1984) Der Allyloxycarbonyl(Aloc)-Rest: Die Verwandlung einer untauglichen in eine wertvolle Aminoschutzgruppe für die Peptidsynthese. *Angew. Chem.* **96**, 426-427.
150. Albericio, F., Chinchilla, R., Dodsworth, D. J., Najera, C. (2001) New Trends in Peptide Coupling Reagents. *Organic Preparations and Procedures International*, **33**, 203-303.
151. Carpino, L. A. (1993) 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Amer. Chem. Soc.*, **115**, 4397-4398.
152. Chan, W. C., White, P. D. (2000) Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis A Practical Approach, *The practical Approach series, Oxford University Press*.
153. Jagoda, E., Controeggi, C., Lee, M. J., Kao, C.-H. K., Szajek, L. P., Listwak, S., Gold, P., Chrousos, G., Greiner, E., Kim, B. M., Jacobson, A. E., Rice, K. C., Eckelman, W. (2003) Autoradiographic Visualization of Corticotropin Releasing Hormone Type 1 Receptors with a Nonpeptide Ligand: Synthesis of [<sup>76</sup>Br]MJL-1-109-2, *J. Med. Chem.*, **46**, 1165-1179.
154. Jones, J. (2002) "Amino Acid and Peptide Synthesis-second edition", Oxford University Press, pp. 92.
155. Thern, B., Rudolph, J. and Jung, G. (2002) Total Synthesis of the Nematicidal Cyclododecapeptide Omphalotin A by Using Racemization-Free Triphosgene-Mediated Couplings in the Solid Phase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **41**, 2307-2309.
156. Carpino, L. A., El-Faham, A. (1995) Tetramethylfluoroformamidinium Hexafluorophosphate: A Rapid-Acting Peptide Coupling Reagent for Solution and Solid Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5401-5402.
157. Carpino, L. A., Sadat-Aalae, D., Chao, H. G., DeSelms, R. H. (1990) [(9Fluorenylmethyl)oxy]carbonyl (Fmoc) amino acid fluorides: Convenient new peptide coupling reagents applicable to the Fmoc/tert-butyl strategy for solution and solid-phase syntheses. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9651-9652.
158. Kaduk, C., Wenschuh, H., Beyermann, M., Forner, K., Carpino, L. A. and Bienert, M. (1996), Synthesis of Fmoc-amino acid fluorides via DAST, an alternative fluorinating agent, *Lett. Peptide Sci.*, **2**, 285-288.
159. Tam, J. P., Riemen, M. W., Merrifield, R. B. (1988) Mechanisms of aspartimide formation: the effects of protecting groups, acid, base, temperature and time. *Peptide research*, **1**, 6-18.
160. Gausepohl, H., Kraft, M., Frank, R. (1989) In situ activation of Fmoc-amino acids by BOP in solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **34**, 287-294.
161. Gazal, S., Gary, G., Gilon, C. (2003) Novel Gly building unit for backbone cyclization: synthesis and incorporation into model Peptides. *Peptides*, **24**, 1847-1852.
162. Gilon, C., Halle, D., Chorev, M., Selinger, Z. and Byk, G. (1991) Backbone cyclization. A new method for conferring conformational constraint on peptides. *Biopolymers*, **31**, 745-750.
163. Nahm, S. and Weinreb, S. (1981) N-Methoxy-N-methylamides as effective acylating agents. *Tetrahedron Lett.*, **22**, 3815-3818.
164. Fehrentz, J. A. and Castro, B. (1983) An efficient synthesis of optically active  $\alpha$ -(t-butoxycarbonylamino)-aldehydes from  $\alpha$ -amino acids. *Synthesis*, **8**, 676-678.
165. Müller, B., Besser, D., Kleinwächter, P., Arad, O., Reissmann, S. (1999) Synthesis of N-carboxyalkyl and N-aminoalkyl functionallized dipeptide building units for the assembly of backbone cyclic peptides. *J. Peptide Res.*, **54**, 383-393.

166. Wen, J. J. and Spatola, A. F. (1997) A systematic approach to the solid-phase synthesis of linear and cyclic pseudopeptide libraries containing  $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$  amide bond surrogates, *J. Pept. Res.*, **49**, 3-14.
167. McMurray J. S., Coleman IV, D. R., Wang, W., Campbell, M. L. (2001) The Synthesis of Phosphopeptides, *Peptide Science*, **60**, 3-31.
168. Perich J. W. (1996) Synthesis of Tyr(P)-containing Peptides via "on-line" phosphorylation of the tyrosine residue on the solid phase, *Lett. Peptide. Sci.*, **3**, 127-132
169. Andrews DM., Kitchin J., Seale PW., (1991) Solid-phase synthesis of a range of O-phosphorylated peptides by post-assembly phosphitylation and oxidation, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **38**, 469-475.
170. Park, M. S., Oh, H. S., Cho, H. and Lee, K. H., (2007) Microwave-assisted solid-phase synthesis of pseudopeptides containing reduced amide bond, *Tetrahedron Lett.*, **48**, 1053-1057.
171. Wieligmann, K., Castro, L. F., Zacharias, M. (2002) Molecular dynamics simulations on the free and complexed N-terminal SH2 domain of SHP-2. *In Silico Biology*, **2**, 305-311.
172. Besser, D., Müller, B., Agricola, I., Reissmann, S. (2000) Synthesis of Differentially Protected N-Acylated Reduced Pseudodipeptides as Building Units for Backbone Cyclic Peptides. *J. Peptide Sci.*, **6**, 130-138.
173. Besser, D., Müller, B., Kleiwächter, P., Greiner, G., Seyfarth, L., Steinmetzer, T., Arad, O., Reissmann, S. (2000) Synthesis and Characterization of Octapeptide Somatotatin Analogues with Backbone Cyclization: Comparison of Different Strategies, Biological Activities and Enzymatic Stabilities. *J. Prakt. Chem.*, **342**, 537-545.
174. Beyermann, M., Bienert, M., Carpino, L., A. "Acid halides" in Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Eds.: Goodman, M., Felix, A., Moroder, L., Toniolo, C. *Houben Weyl, E 22a*, pp.486-491, Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 2002.
175. Wenschuh, H., Beyermann, M., Winter, R., Bienert, M., Ionescu, D., Carpino, L. A. (1996) Fmoc-Amino Acid Fluorides in Peptide Synthesis-Extension of the Method to Extremely Hindered Amino Acids. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 5483-5486.
176. Triolo, S. A., Ionescu, D., Wenschuh, H., Sole, N. A., El-Faham, A., Carpino, L. A., Kates, S. A. (1998) Recent Aspects of the Use of Tetramethylfluoroformamidinium Hexafluorophosphate (TFFH) as a Convenient Peptide Coupling Reagent. Proceeding of the European Peptide Symposium (Eds. R. Ramage and R. Eplon) Edinburgh, Scotland, The European Peptide Society, pp 839-840.
177. Brandt, M., Gammeltoft, S., Jensen, K. J. (2006) Microwave Heating for Solid-Phase Peptide Synthesis: General Evaluation and Application to 15-mer Phosphopeptides. *Intern. J. Pep. Res. and Ther.*, **12**, 349-357.
178. Yu, H. M., Chen, S. T., Wang, K. T. (1992) Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation. *J. Org. Chem.*, **57**, 4781-4784.
179. Coy, D. H., Hocart, S. J., Sasaki, Y. (1988) Solid phase reductive alkylation techniques in analogue peptide bond and side chain modification, *Tetrahedron*. **44**, 835-841.
180. Sasaki, Y. and Coy, D. H. (1987) solid phase synthesis of peptides containing the  $\text{CH}_2\text{-NH}$  peptide isostere. *Peptides*, **8**, 119-121.
181. Schumann, C., Seyfarth, L., Greiner, G., Reissmann, S. (2000) Synthesis of different types of dipeptide building units containing N- or C-terminal arginine for the assembly of backbone cyclic peptides. *J. Peptide Res.*, **55**, 428-435.
182. Arold, H., Reissmann, S. (1970) Peptide. XV. Synthese von Analoga des Bradykinins mit threo Phenylserin. *J. prakt. Chem.*, **312**, 1130-1144.
183. Imhof, D., Nothmann, D., Zoda, M. S., Hampel, K., Wegner, J., Böhmer, F. D., Reissmann, S., (2005) Synthesis of linear and cyclic phosphopeptides as ligands for the N-terminal SH2-domain of protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Pep. Sci.*, **11**, 390-400.

184. Dölling, R., Beyermann, M., Haenel, H., Kernchen, F., Krause, E., Franke, P., Brudel, M., Bienert, M. (1994) Piperidine-mediated side product formation for Asp(OBu<sup>t</sup>)-containing peptides. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **7**, 853–854.
185. Nishikata, M., Suzuki, K., Yoshimura, Y., Deyama, Y., Matsumoto, A. (1999) A phosphotyrosine-containing quenched fluorogenic peptide as a novel substrate for protein tyrosine phosphatases. *Biochem. J.* **343**, 385–391.
186. Imhof, D., Wieligmann, K., Hampel, K., Nothmann, D., Zoda, M. S., Schmidt-Arras, D., Zacharias, M., Böhmer, F. D., Reissmann, S. (2005) Design and Biological Evaluation of Linear and Cyclic Phosphopeptide Ligands of the N-Terminal SH2-Domain of Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1. *J. Med. Chem.*, **48**, 1528–1539.
187. Medzihradsky, K. F., Ambulos, N. P., Khatri, A., Osapay, G., Remmer, H. A., Somogyi, A., Kates, S. A. (2002) Mass Spectrometry analysis for the determination of side reactions for cyclic peptides prepared from an Fmoc /Bu<sup>t</sup>/Dmb protecting group strategy. *Lett. Pept. Sci.*, **8**, 1–12.
188. Keilhack, H., Müller, M., Böhmer, S. A., Frank, C., Weidner, K. M., Birchmeier, W., Ligensa, T., Berndt, A., Kosmehl, H., Günther, B., Müller, T., Birchmeier, C., Böhmer, F. D. (2001) Negative Regulation of Ros-Receptor Tyrosine Kinase Signaling: An Epithelial Function of the SH2 Domain Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1. *J. Cell. Biol.*, **152**, 325–334.

---

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich habe die Arbeit selbständig angefertigt. Alle beschriebenen Aminosäurederivate, Pseudopeptide und Oktapeptide wurden von mir synthetisiert. Für die chemische Analyse (H-NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, ESI-MS) und die Mikrowellen-Synthesen habe ich technische Unterstützung durch die Gerätespezialisten erhalten. Das Gleiche gilt für die Aktivitätsbestimmungen und die Internalisierungsversuche.

Unterstützung habe ich bei der sprachlichen Korrektur der Arbeit erhalten.

Mohammad Safa Zoda

---

**Erklärung zu früheren oder laufenden Promotionsverfahren**

Ich habe bisher keine andere Promotionsarbeit angefertigt oder eingereicht, weder in Syrien noch in einem anderen Land.

Mohammad Safa Zoda

---

## Lebenslauf

Name	Mohammad Safa Zoda
Geburtsdatum	02.01.1971
Geburtsort	Hama (Syrien)
Familienstand	verheiratet

---

9/1976-6/1982	Grundschule in Hama
9/1982-7/1988	Ibn-Rushd-Schule, Hama  Abschluss: Abitur
9/1988-7/1992	Studium der „Physikalischen und Chemischen Wissenschaften“ an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Aleppo
9/1992-9/1993	Diplomarbeit in „Organischer Chemie“ an der Universität Aleppo
10/1993-6/1996	Oberschullehrer in Al-Rakka
7/1996-1/2003	Wissenschaftlicher Assistent an der Zahnmedizinischen Fakultät der Tischrin Universität für das Fach Biochemie
10/2003-2009	Doktorarbeit am Institut für Biochemie und Biophysik unter Leitung von Prof. Dr. T. Heinzel/Prof. Dr. S. Reißmann

Mohammad Safa Zoda

---

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Siegmund Reißmann für die Aufnahme in seine Gruppe und die Vergabe des interessanten Themas sowie die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit unter seiner Betreuung durchzuführen. Besonders danke ich ihm für die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen und die zahlreichen Anregungen und für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. T. Heinzel danke ich für die Unterstützung bei der Weiterführung der Arbeit.

Für die Bereitstellung und Nutzung der HPLC und ihre Diskussionsbereitschaft danke ich Frau Dr. Diana Imhof.

Herzlich danken möchte ich allen Freunden und Kollegen des Institutes für Biochemie und Biophysik der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für ihre hilfreiche Unterstützung bedanken.

Für die Unterstützung bei der Anfertigung der Massenspektren danke ich Frau Andrea Perner sehr herzlich. Herrn Dr. Wolfgang Günther danke ich für das Aufnehmen der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren, Frau Sonja Seidel für die Unterstützung bei der Bearbeitung der HPLC-Elutionsdiagramme zum proteolytischen Abbau und Frau Franziska Mußbach für ihre Hilfe bei der Bestimmung der biologischen Aktivitäten.